

Phytodisponibilité des nanomatériaux, et impact sur le prélèvement d'éléments traces métalliques

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Aix Marseille
Faculté des Sciences et Techniques
Discipline : Géosciences de l'Environnement

Soutenue publiquement par
Clément LAYET

11/12/2017

Jury

Mme Corinne CHANEAC	Professeure des Universités, UPMC Paris	Rapporteure
Mme Géraldine SARRET	Directrice de Recherche, ISTERRE-UGA Grenoble	Rapporteure
Mme Isabelle DEPORTES	Docteure, Ingénieure ADEME Angers	Examinatrice
Mme Catherine KELLER	Professeure des Universités, Aix-Marseille Université, CEREGE Aix-En-Provence	Examinatrice
Mme Camille LARUE	Chargée de Recherche, Ecolab Toulouse	Examinatrice
Mr Emmanuel DOELSCH	Directeur de Recherche, CIRAD Aix-En- Provence	Directeur de thèse
Mme Mélanie AUFFAN	Directrice de Recherche, CNRS, CEREGE Aix- En-Provence	Co-directrice de thèse
Mme Catherine SANTAELLA	Chargée de Recherche, CNRS, LEMIRE Cadarache	Co-directrice de thèse

Table des matières

Remerciements.....	1
Résumé	2
Abréviations	4
Introduction générale.....	6
Chapitre I : Synthèse bibliographique, Objectifs et mise en œuvre méthodologique de la thèse...	8
I.1 les nanomatériaux	8
I.1.a Définition des nanomatériaux	8
I.1.b Intérêt industriel des nanomatériaux	10
I.1.c Rejet et compartiments cibles des nanomatériaux en fin de vie dans l'environnement	12
I.1.d Dynamique des nanomatériaux dans les sols	15
I.1.d.i Transformation physico-chimique des NMs en milieu aqueux	15
I.1.d.ii Rétention et transport des nanomatériaux par la phase solide du sol.....	20
I.2 Le Concept de phytodisponibilité	22
I.2.a Disponibilité environnementale	23
I.2.b Biodisponibilité environnementale	23
I.2.c Biodisponibilité toxicologique	24
I.3 Anatomie, morphologie et physiologie de la racine.....	24
I.3.a Transport racinaire des éléments	28
I.3.b Mécanisme d'absorption des éléments dans les cellules racinaires	29
I.4 Phytodisponibilité des Nanomatériaux	31
I.4.a Biodisponibilité environnementale des NMs	31
I.4.b Biodisponibilité toxicologique des nanomatériaux	36
I.5 Intégrer la complexité du milieu de culture	38
I.6 Questions et objectifs de la thèse	41
Chapitre II :Utilisation du RHIZOtest pour l'étude de la phytodisponibilité des nanomatériaux.	
Premier cas d'étude : le dioxyde de cérium.	43
II.1 Résumé de l'étude.....	43
II.2 Evidence that soil properties and organic drive the phytoavailability of cerium oxide nanoparticles.....	46
Chapitre III : Etude de la phytodisponibilité des nanomatériaux en fonction des propriétés des sols et des nanomatériaux. Deuxième cas d'étude : le dioxyde de titane.	69
III.1 Résumé de l'étude	69
III.2 Phytoavailability of TiO ₂ nanoparticle: soil type and nanoparticle shape matters.	71

Chapitre IV : Etude de la phytodisponibilité des nanomatériaux en fonction des propriétés des sols et des nanomatériaux. Troisième cas d'étude : l'argent (Ag⁰).	86
IV.1 Résumé de l'étude	86
IV.2 Phytoavailability of silver at predicted environmental concentration: the nanoparticulate or ionic form does not matter.....	88
Chapitre V : Discussion, conclusion et perspectives.....	105
V.1 Influence de la sous classe des plantes sur la phytodisponibilité des NMs	105
V.2 Influence de la formulation des NMs sur leur phytodisponibilité	106
V.3 Influence des propriétés des sols sur la phytodisponibilité des NMs	107
V.4 Perspectives	108
V.4.a Etudier la phytodisponibilité des nanomatériaux en fonction de leur stade de vie.....	109
V.4.b Améliorer la formulation d'un nanomatériau en fonction de sa phytodisponibilité, évaluée en RHIZOtest	109
V.4.c Comparer les résultats du RHIZOtest à des outils de plus grande échelle : le functional assay	109
Références	111

Table des Illustrations

Figure 1 : Classification des nanomatériaux en fonction de leur localisation dans le matériau (Foss Hansen et al., 2007).....	10
Figure 2 : Flux globaux des NMs depuis leur fabrication jusqu'aux compartiments cibles de l'environnement ou dans les décharges (Keller et al., 2013)	10
Figure 3 : Evolution des concentrations estimées de différents NMs dans les sols en fonction des années de publications (Gottschalk et al., 2015; Gottschalk et al., 2009; Johnson and Park, 2012; Park et al., 2008).....	14
Figure 4 : Synthèse des différentes interactions possibles des NMs avec des macromolécules (NOM : Natural Organic Matter) (Lowry et al., 2012b).	16
Figure 5: Illustration des différentes modalités de dissolution des NMs de métaux (Me) et d'oxyde métallique (MeO _x), d'après (Wiesner and Bottero, 2016).....	17
Figure 6 : Energie potentielle entre deux particules de fer en fonction de la distance entre les deux particules. Les résultats varient en fonction des pH (12, 10, 8, 7, 6, 4, 2), en l'absence d'acide humique (a) ou avec 100 mg.L ⁻¹ d'acide humique (b) (Baalousha, 2009).....	18
Figure 7 : Modification de la stabilité des NMs en fonction de la matière organique et des ions monovalents et divalents (Grillo et al., 2015)	19
Figure 8 : Illustration des différents phénomènes composant le transport et la rétention des NMs dans le sol: 1 formation des colloïdes, 2 lessivage des NMs, 3 homoagrégation, 4 désagrégation, 5 sédimentation, 6 hétéroagrégation, 7 filtration par la taille, 8 rétention, 9 dépôt, 10 transport par convection (Cornelis et al., 2014).....	21
Figure 9: Répartition des différents tissus racinaires et composition des différentes matrices extracellulaires. Schéma de racine issu de Dolan et al. (1993). Composition chimique de la subérine d'après (Graça and Santos, 2007). Composition chimique de la paroi pectocellulosique d'après (Somssich et al., 2016). Composition chimique de la lignine d'après (Vanholme et al., 2010). Glu : glucose ; Xylose : Xyl ; Galactose : Gal ; Fucose : Fuc ; Arabinose : Ara ; Acide galacturonique : GalA ; Apiose : Api ; Acide ulosonique :Kdo ; acide O-acetyl-L-aceric acid : Ace ; Acide heptulosarique : Dha.....	27
Figure 10: Transport des éléments nutritifs dans les racines. Figure issue de Barberon and Geldner (2014).La partie A représente les différents modes de transport des éléments depuis le sol jusqu'à l'endoderme. La partie B se concentre sur les modes de transport des éléments entre le parenchyme cortical et l'endoderme.	29
Figure 11 : Mode d'intégration dans les cellules de différents éléments issus du sol. Légende spécifique au plasmodesme : C : Cytoplasme ; D : microtubule ; P : protéine ; RE : réticulum endoplasmique. Illustration inspirée de (Roberts and Oparka, 2003).....	30
Figure 12 : Toxicité induite par les NMs dans les cellules. Génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), oxydation de protéines ou de lipides membranaires. Les flèches orientées vers le haut indiquent une augmentation de la concentration en ROS, SOD (superoxyde dismutase), ou H ₂ O ₂ . Illustration inspirée de (Hossain et al., 2015).....	37
Figure 13 : Image des appareils racinaires de fétuque (A) et de tomate (B), lors de la récolte après la phase de croissance en hydroponie.....	41
Figure 14: cycle de vie d'un nanomatériau, comprenant une phase d'extraction (A), de production des NMs primaires sans enrobage (B), de formulation (C), de fabrication des produits (dispersion des NMs dans une matrice) (D), d'utilisation du produit (E), et d'une fin de vie (recyclage/traitement des déchets, mise en décharge) (F).	108

Remerciements

Avant toute chose, je remercie l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mes travaux, en particulier mes rapporteuses Corinne Chanéac et Géraldine Sarret.

Je remercie L'ADEME et Isabelle Deportes, ainsi que le labex SERENADE et Jean-Yves Bottero, qui nous ont fait confiance dans la mise en place de ce projet et son déroulement.

Je tenais à remercier ma direction de thèse composée d'Emmanuel Doelsch, mon Directeur, et de Mélanie Auffan et Catherine Santaella mes deux Co-directrices, pour l'encadrement, et pour ce goût de la recherche qu'ils m'ont transmis au fil du déroulement de la thèse.

Je tiens également à remercier les équipes avec lesquelles j'ai travaillé pour leur accueil et l'ambiance de travail dont je bénéficiais à chacun de mes passages : INTERFAST au CEREGE, L'unité Recyclage Et Risques au CIRAD, et le LEMIRE à Cadarache.

Je vous remercie également toutes et tous pour votre disponibilité et votre écoute, malgré mes missions autour du monde, de la Caroline du Nord jusqu'à Montferrier-sur-Lez.

Résumé

Un nanomatériau (NM) est un objet dont au moins une dimension comprise entre environ 1 et 100 nm, ce qui lui confère une réactivité et des propriétés différentes du même matériau de plus grande taille. L'étendue des applications potentielles a amplifié la production de nanomatériaux (NMs) au début des années 2000. Leur fabrication et leur utilisation dans de nombreux produits de consommation courante (cosmétiques, revêtements de surface...) ou pour des applications de hautes technologies conduit à leur relargage dans l'environnement (eau, sol, air).

Le sol constitue un compartiment privilégié d'accumulation des NMs au cours de leur cycle de vie, en particulier via leur relargage à partir de produits de consommations dans les eaux usées, le traitement de ces eaux en stations d'épuration et l'épandage dans les sols de biosolides provenant des boues résiduelles, ou suite au rejet dans l'air lors de l'utilisation du produit (additif de carburant) ou par lessivage des surfaces extérieures (revêtements de façade...). En fonction des scénarios de relargage, des propriétés physicochimiques des NMs, ainsi que des réglementations et usages dans les différents pays, la modélisation des concentrations environnementales de NMs dans les sols prédit des concentrations de l'ordre de 10^{-4} à $10^4 \mu\text{g.kg}^{-1}$ pour des NMs à base de Ag, de CeO_2 ou encore de TiO_2 dans des sols agricoles (sans ajout de biosolides). L'accumulation de NMs dans les sols cultivés pose donc la question du transfert des NMs dans les chaînes trophiques via les végétaux.

L'objectif de cette thèse a été de déterminer la biodisponibilité pour les plantes (phytodisponibilité) de NMs, en fonction de propriétés intrinsèques aux NMs (chimie, taille, forme, charge de surface et enrobage), et de paramètres environnementaux (propriétés physico-chimiques des sols), ou du type de plantes cultivées (monocotylédones vs dicotylédones).

Nous avons pour cela adapté un biotest initialement conçu pour déterminer la phytodisponibilité de métaux présents dans les sols : le RHIZOtest. Il présente l'avantage de normaliser la surface de contact entre l'appareil racinaire et le sol via une membrane, ce qui permet de récupérer un système racinaire exempt de particules de sol.

Nous avons déterminé l'influence de la nature chimique, la taille, la forme et l'enrobage, en utilisant des NMs de CeO_2 , TiO_2 et Ag^0 , et en incluant dans la gamme de concentrations étudiées, des doses proches des concentrations environnementales prédites par la modélisation.

En s'affranchissant de l'architecture racinaire, nous avons montré que la sous-classe de plantes, monocotylédones (fétuque) ou dicotylédone (tomate) n'influence pas la phytodisponibilité de NMs de CeO_2 .

De façon générale, la concentration d'exposition des plantes aux NMs, les propriétés des sols (texture et matière organique) et le comportement des NMs dans le sol et la solution de sol, sont les principaux facteurs influençant leur phytodisponibilité. Dans le cas des NMs de CeO_2 et d'Ag, la

phytodisponibilité des NMs est limitée par le taux d'argile. La concentration en matière organique, provenant du sol ou de l'enrobage favorise la phytodisponibilité de NMs de CeO_2 . La nature de l'enrobage ne modifie pas la phytodisponibilité des NMs d' Ag^0 . La phytodisponibilité de NMs de TiO_2 pour la fétuque est inférieure à celle des NMs de CeO_2 et Ag^0 , et le principal facteur à l'origine du flux est la concentration d'exposition. La forme des nanomatériaux et la surface spécifique n'ont pas d'impact significatif sur leur phytodisponibilité.

L'utilisation du RHIZOtest nous a donc permis de cribler l'effet d'un grand nombre de facteurs environnementaux sur la phytodisponibilité des NMs à des concentrations proches de celles prédites dans les sols par la modélisation. Le RHIZOtest est proposé comme outil d'aide à la conception de NMs avec une phytodisponibilité contrôlée ou pour prévoir le transfert dans les chaînes trophiques en fonction de l'environnement de la plante.

Abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique

Ag: Argent

BET: Brunauer, Emmet and Teller method

BH: Benjamini-Hochberg

CDF: Cation diffusion facilitator

CEC : Capacité d'échange cationique

CECR: Capacité d'échange cationique racinaire

CeO₂: Dioxyde de cérium (Cerium dioxide)

DLS: Dynamic light scattering

DOC: Dissolved organic carbon

HATS: High affinity transporter

HERDF: High energy resolution detected fluorescence mode

HMAs: Heavy metal transporting ATPases

ICP-MS: Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

IEP: Isoelectric point

NMs: Nanomatériaux

NM: Nanomatériau

NOM: Natural organic matter

NPs: Nanoparticles

OM: Organic matter

PCA: Principal component analysis

PEC: Predicted environmental concentrations

PERMANOVA: Permutational analysis of variance

PVP: Polyvinylpyrrolidone

RDA: Redundancy analysis

ROS: Reactive oxygen species

SEL: Size Exclusion Limit

SiO₂: Dioxyde de silicium

SSA: Specific surface area

TEM: Transmission electron microscopy

TiO₂: Dioxyde de titane (Titanium dioxide)

XANES: X-Ray absorption near edge structure

XAS: X-Ray absorption microscopy

XRD: X-Ray diffraction

YSL: Yellow Stripe1-like family transporter

ZIP: Zinc Iron transporter-like protein

ZnO: Oxyde de zinc

ZnS: Sulfure de zinc

Introduction générale

Le développement de l'industrie a induit depuis plusieurs décennies le rejet d'éléments perturbateurs pour les êtres vivants. L'un des vecteurs de ces rejets entre la source industrielle et les êtres vivants est le sol. Nous pouvons prendre l'exemple des métaux lourds issus de diverses activités industrielles (sidérurgie, cokerie, etc...). Ils présentent des risques pour la santé et l'environnement. La Révolution Industrielle a entraîné une pollution grandissante des différents milieux (eau, air, et sol) par des éléments issus des différentes industries. A la fin du XIX^{ème} siècle, elle a été suivie d'une nouvelle définition de la pollution, à savoir une dégradation d'un milieu par un élément ([Massard-Guilbaud, 2010](#); [Thorsheim, 2006](#)). La Révolution Industrielle a également été suivie d'une volonté de déterminer les conséquences de ces différentes pollutions sur l'environnement. Le sol est le support de nombreuses activités humaines (agriculture, extraction minière, etc), tout en étant altéré par ces activités ([Smith et al., 2016](#)). Les sols peuvent être le lieu d'accumulation de polluants organiques ou de métaux lourds, susceptibles d'altérer la qualité des sols. Leur mobilité dans le sol est variable en fonction de plusieurs paramètres qui leur est propres et de paramètres environnementaux ([Meuser, 2010](#)). Cette mobilité représente un risque supplémentaire pour l'homme. Il y a donc eu au fil des années, plusieurs études sur le sol et sur la dynamique des polluants s'y accumulant, ainsi que la mise en place de politiques de préventions et de restaurations de la ressource sol ([Bustamante et al., 2014](#)). Depuis le début des années 2000, l'essor et les perspectives offertes par les nanotechnologies ont amené à la production croissante de nanomatériaux (NMs). Ces éléments présentent des propriétés spécifiques en termes de taille et de réactivité. Ils ont donc un intérêt dans plusieurs domaines industriels (activité photocatalytique, catalyse chimique, usage biocide...). Les nouvelles propriétés en font donc des entités chimiques uniques que l'on peut différencier des matériaux massifs. Cependant, la synthèse et l'utilisation de ces produits entraînent des rejets dans l'environnement (rejets atmosphériques, aquatiques ou terrestres). Parallèlement à cet essor industriel, plusieurs études ont mis en évidence une toxicité des NMs liée à leurs propriétés spécifiques.

Tout comme les précédents polluants émergents, la Recherche étudie le devenir des NMs selon deux axes, la toxicologie des NMs et leurs transferts dans différents compartiments d'un écosystème.

Le sol constitue une matrice complexe, régulant la dynamique des polluants en fonction de ces propriétés physico-chimiques (texture, capacité d'échange cationique, pH, etc). Etant également le support du développement de végétaux, il constitue un milieu important du transfert des NMs vers d'autres compartiments d'un écosystème.

Etudier l'exposition des plantes aux NMs doit donc prendre en compte leur phytodisponibilité en considérant le paramètre sol. Cependant, l'étude des risques s'appuie sur la concentration disponible d'un élément polluant pour la plante. Les estimations des rejets des NMs sont encore peu nombreuses

mais on considère que les concentrations rejetées dans le sol sont faibles (comprises entre le milligramme par kilo de sol et le nano gramme par kilo de sol). Il est donc difficile d'étudier la disponibilité de NMs dans des sols ayant une concentration naturelle équivalente ou plus importante du même élément.

Il convient donc d'étudier la phytodisponibilité de ces polluants émergents en prenant en compte le sol et l'exposition des NMs à des concentrations les plus proches des scénarii établis jusqu'à maintenant.

Combiner ces deux facteurs a été possible grâce à l'utilisation du RHIZOtest (ISO 16198). Ce biotest végétal permet d'étudier la phytodisponibilité d'éléments dans des sols. Le projet a impliqué la collaboration du CEREGE (UM 34, Université Aix-Marseille, CNRD, IRD), et du CIRAD (Unité Recyclage et Risque, département PERSYST).

L'objectif de cette thèse est d'étudier l'influence de plusieurs paramètres environnementaux (nature des sols, espèces des plantes) et spécifiques aux NMs (tailles, forme, présence d'enrobage) sur la phytodisponibilité des NMs. Trois NMs ont été choisis pour évaluer ces paramètres : le TiO_2 , le CeO_2 et l' Ag^0 . Ces trois NMs ont été choisis pour leurs stabilités chimiques respectivement décroissantes, ce qui pourrait induire une différence de réactivité avec un même environnement. Deux sous classes de plantes différentes ont été étudiées lors de ces travaux : *Solanum lycopersilum* (dicotylédone) et *Festuca arundinacea* (monocotylédone).

Le chapitre I est une synthèse bibliographique présentant les différents travaux concernant les propriétés des NMs et les différents aspects de leur phytodisponibilité, ainsi qu'une définition des différents objectifs et des choix méthodologiques.

Le chapitre II présente les résultats concernant la phytodisponibilité des NMs de CeO_2 , l'impact des propriétés des sols et de la plante, ainsi que la spéciation du cérium interagissant avec les racines.

Le chapitre III présente les résultats concernant la phytodisponibilité des NMs de TiO_2 et l'impact des propriétés des sols et de la formulation des NMs de TiO_2 .

Le chapitre IV présente les résultats concernant la phytodisponibilité des NMs d' Ag et l'impact des propriétés des sols et de la formulation des NMs d' Ag , comparée à l'argent dissous (AgNO_3).

Le chapitre V synthétise les différents résultats dans le but d'évaluer les impacts des différents paramètres étudiés. Cette discussion nous permettra de conclure sur l'utilisation du RHIZOtest dans le cadre du devenir des NMs dans l'environnement.

Chapitre I : Synthèse bibliographique, Objectifs et mise en œuvre méthodologique de la thèse

I.1 les nanomatériaux

I.1.a Définition des nanomatériaux

- Une définition législative

La recherche d'éventuels effets toxiques liés à l'exposition aux nanomatériaux (NMs) sur les êtres vivants (phytotoxicité, cytotoxicité, génotoxicité...) a commencé au début des années 2000 ([Gorman, 2002](#); [Lam et al., 2004](#); [Maynard et al., 2004](#); [Oberdörster, 2004](#)). A la demande des communautés scientifiques et industrielles, une définition commune a été établie au niveau de la commission Européenne ([European-Union, 2011](#)). Elle avait pour objectif de permettre la réglementation de l'utilisation des NMs au sein de produits commercialisés dans le marché Européen.

En 2011, la Commission Européenne propose la définition suivante :

1.« On entend par «nanomatériau» un matériau naturel, formé accidentellement ou *manufacturé contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50 % des particules, dans la répartition numérique par taille, présente une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm.*

2. Dans des cas spécifiques, lorsque cela se justifie pour des raisons tenant à la protection de *l'environnement, à la santé publique, à la sécurité ou à la compétitivité, le seuil de 50 % fixé pour la répartition numérique par taille peut être remplacé par un seuil compris entre 1 % et 50 %.*

[...]

3. Lorsque cela est techniquement faisable et *requis en vertu d'une réglementation spécifique*, la conformité avec la définition établie au point 2 peut être déterminée sur la base de la surface spécifique en volume. Tout matériau est à considérer comme relevant de la définition établie au point 2 *dès lors qu'il présente une surface spécifique en volume supérieure à 60 m² /cm³*. Cependant, tout matériau qui, sur la base de sa répartition numérique par taille, constitue un nanomatériau est à considérer comme correspondant à la définition établie au point 2 *même s'il présente une surface spécifique en volume inférieure à 60 m² /cm³*.

Néanmoins, le dernier article précise que cette définition est susceptible d'être modifiée lors d'une révision en 2014. Cette révision a été reportée à 2016. Une communication du 5 août 2016 de la Commission Européenne ([European Commission, 2016](#)) présente une réévaluation de la définition des NMs. La commission se base sur le rapport technique du Joint Research Centre ([Hubert et al., 2015](#)), qui estime que la définition nécessite des clarifications concernant la surface spécifique, dont l'emploi

rend plus difficile la détermination de la classe d'un matériau. Le seuil de taille et de distribution de taille n'est pas remis en question et constitue encore l'aspect principal de la définition.

- Une vision physico-chimique des nanomatériaux

Selon la définition précédente, les NMs sont définis par la taille d'au moins une de leur dimension, inférieure à 100 nm.

Or l'intérêt des NMs réside dans i) leur taille réduite leur conférant une surface spécifique supérieure au matériau massif, et ii) des propriétés nouvelles ([Auffan et al., 2009](#)). Nous pouvons prendre l'exemple des particules d'or (Au). Ce métal est notamment connu pour être résistant à l'oxydation. Le même matériau dans des dimensions nanométriques peut pourtant acquérir des propriétés catalytiques ([Daniel and Astruc, 2004](#)). D'autres propriétés modifiées peuvent être citées, comme une diminution des températures de fusion des particules d'or ou d'étain ([Dick et al., 2002](#); [Lai et al., 1996](#)), ou des capacités mécaniques modifiées des nanotubes de carbones ([Saito et al., 1998](#)). Ces différentes propriétés distinctes de celles des matériaux massifs ne se manifestent pas nécessairement lorsque l'une des dimensions de l'objet est inférieure à 100 nm. [Auffan et al. \(2009\)](#) ont mis en évidence que les nanomatériaux présentent des propriétés de surfaces différentes des matériaux massifs à partir d'une taille comprise entre 20 et 30 nm. Le seuil de 100 nm ne suffit donc pas à définir un matériau comme appartenant à la famille des NMs.

Au-delà du seuil de 100nm, les NMs offrent une diversité de structures. Les NMs peuvent être classés en fonction de leur localisation dans les matériaux ([Foss Hansen et al., 2007](#); [Vance et al., 2015](#)). Nous pouvons distinguer :

- Les matériaux massifs nanostructurés : on distingue dans cette classe les objets composés d'un seul type de matériau ([Figure 1](#)), ou d'au moins deux matériaux ([Figure 1Ia](#)).
- Les matériaux ayant une surface nanostructurée ([Figure 1 IIa](#)) ou des films nanométriques déposés en surface ([Figure 1 IIb et IIc](#)).
- Les nanoparticules dispersées dans des matrices solides ([Figure 1IIIb](#)), liquides ([Figure 1IIIb](#)), gazeuses ([Figure 1 IVd](#)), ou encore déposées en surface des matériaux ([Figure 1IIIa](#)).

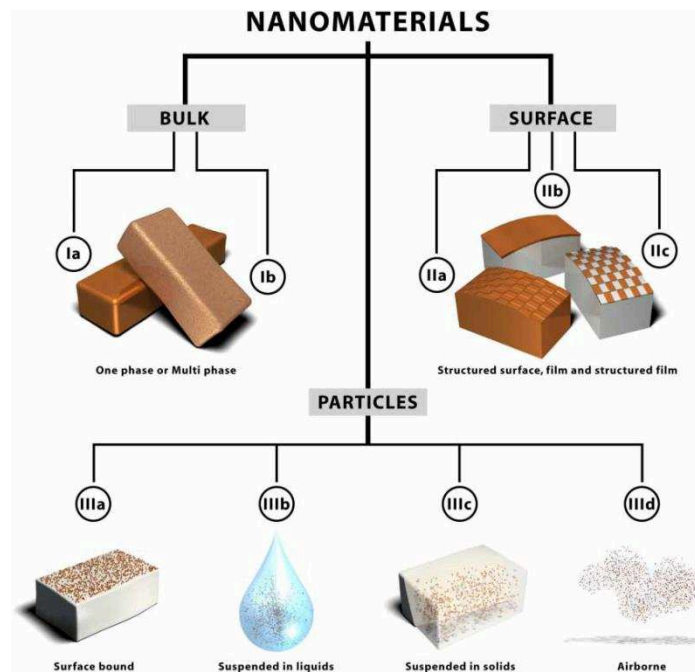


Figure 1 : Classification des nanomatériaux en fonction de leur localisation dans le matériau ([Foss Hansen et al., 2007](#)).

I.1.b Intérêt industriel des nanomatériaux

Les nanomatériaux ont progressivement été utilisés dans de multiples secteurs d'activité, et constituent un marché qui a été évalué à environ quinze milliards de dollars en 2015 ([Singh Sahu, 2016](#)). Plusieurs de ces applications sont précisées dans la [Figure 2](#) ([Keller et al., 2013](#)). En termes d'exemples, nous allons nous concentrer sur deux domaines, les produits de consommation courante (flux 1, 2, 5, et 6 de la [Figure 2](#)), et les produits phyto pharmaceutiques.

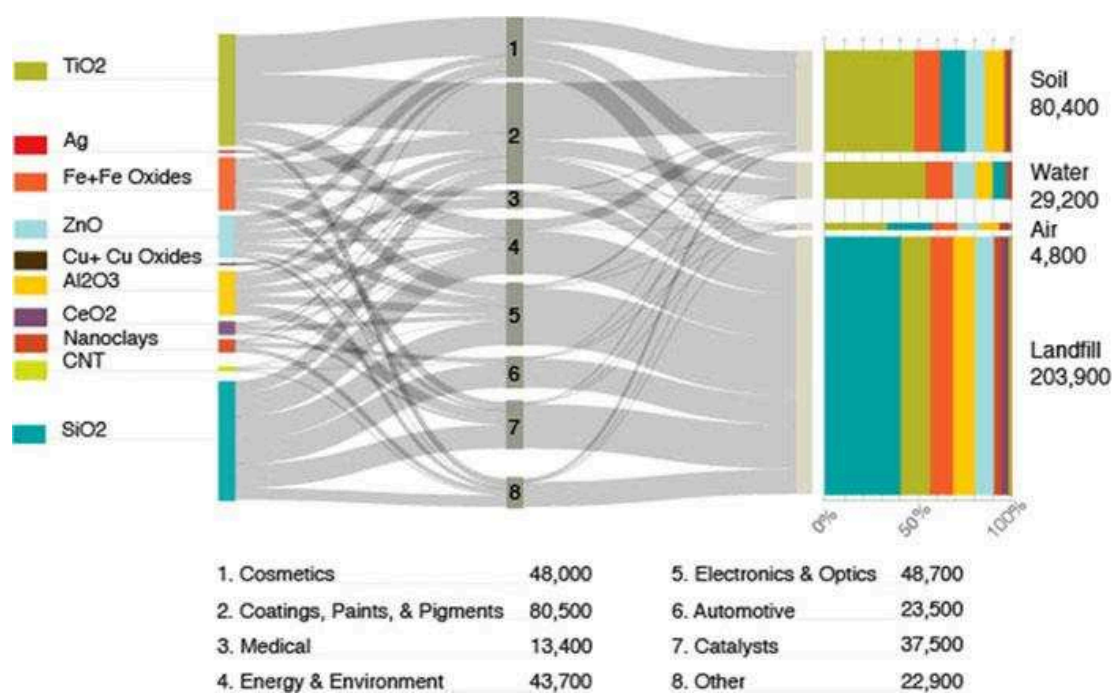


Figure 2 : Flux globaux des NMs depuis leur fabrication jusqu'aux compartiments cibles de l'environnement ou dans les décharges ([Keller et al., 2013](#))

L'utilisation des NMs dans les produits de la vie courante a été progressive au cours de la dernière décennie. Malgré la nature diversifiée des NMs utilisés, un groupe restreint de NMs représente une part majoritaire de la production mondiale intégrée dans des produits de consommation.

Nous retrouvons essentiellement SiO_2 , TiO_2 , le fer, les oxydes d'aluminium et de zinc ([Keller and Lazareva, 2014](#); [Vance et al., 2015](#)) en terme de quantités rejetées (respectivement 95000 tonnes, 88000 tonnes et 42000 tonnes). Cependant, [Caballero-Guzman and Nowack \(2016\)](#) soulignent l'incertitude quant à l'estimation des quantités de NMs rejetés. Ces analyses se basent sur les travaux de caractérisations et des processus d'altération des produits contenant des NMs, or ces études ne recouvrent que 20% des NMs utilisés dans des applications industrielles, et 36% dans des produits de grande consommation.

Les NMs de SiO_2 sont principalement utilisés en tant que semi-conducteurs ou pour leur propriétés d'isolant électrique ([Adams et al., 2006](#)).

Les NMs de TiO_2 sont utilisés pour leurs réactivités avec la lumière. Ces propriétés permettent une intégration dans les produits cosmétiques et dans les peintures ([Keller et al., 2013](#)). Les NMs de TiO_2 sont par exemple utilisés dans les crèmes solaires, afin d'absorber les rayons ultra-violets (photo-réactivité) ([Lu et al., 2015](#)). La taille nanométrique augmente le ratio surface/volume, permettant une optimisation de la réactivité des matériaux. Les NMs TiO_2 sont également utilisés dans les peintures. L'utilisation dans les peintures permet d'améliorer notamment les propriétés de protection contre la dégradation par les algues et les bactéries ([Yedra et al., 2016](#)), en formant des espèces réactives de l'oxygène (ROS) grâce au principe de la photocatalyse ([Herrmann et al., 2007](#)). Ces ROS vont pouvoir oxyder la matière organique. Du fait de leur taille réduite, les NMs peuvent également améliorer la transparence de certains revêtements ([Khanna, 2008](#)).

Les NMs d'argent (Ag) représentent une production annuelle plus faible (452 tonnes) que les NMs précédemment décrits ([Keller et al., 2013](#)). Cependant, ils sont intégrés dans un plus grand nombre de produits ([Vance et al., 2015](#)). Les NMs d'Ag sont principalement utilisés pour leurs propriétés biocides ([Anjum et al., 2013](#)).

Les NMs peuvent également être utilisés en tant qu'additifs dans des carburants. Les NMs de CeO_2 peuvent par exemple optimiser la combustion d'hydrocarbures, réduire les émissions de monoxyde de carbone ([Annamalai et al., 2016](#); [V. Arul Mozhi Selvan et al., 2009](#)). L'utilisation de tels additifs comme celui de type Envirox™, peut augmenter jusqu'à 30% la part des particules de plus petites tailles émises par la combustion des carburants ([Zhang et al., 2013](#)).

Si les NMs ont principalement été utilisés dans des produits de la vie courante (automobile, alimentation, peintures...), il existe aussi des perspectives dans des domaines d'activité plus spécifiques, tel que que l'agriculture via les produits phytopharmaceutiques ([Kah et al., 2013](#)). Les NMs de TiO_2 peuvent être utilisés comme éléments permettant de limiter la rémanence de la matière active grâce à leurs propriétés photocatalytiques ([Guan et al., 2008](#)). Les NMs peuvent aussi être

enrobés avec la matière active ([Sooresh et al., 2011](#)). Dans ce cas, ils facilitent le passage de la matière active à travers les barrières des organismes cibles, grâce à leurs hautes surface spécifique ([Sooresh et al., 2011](#)). Enfin, le NM peut constituer lui-même une matière active. Nous pouvons prendre l'exemple du SiO₂ comme agent luttant contre le charançon du riz ([Debnath et al., 2011](#)). Le SiO₂ à l'échelle nanométrique présente une toxicité pour l'insecte deux à trois fois supérieure au même matériau massif. Les nanomatériaux semblent donc avoir un intérêt dans le cadre de la lutte contre les ravageurs de cultures ([Khot et al., 2012](#)).

Cependant le développement au niveau industriel reste encore limité. Si, il y a quelques années, les industries d'agrochimie communiquaient à propos de l'utilisation de NMs, les récentes remises en question du risque lié au NMs par la société civile ont restreint les campagnes de communication. Il est alors difficile de connaître vraiment l'état de développement de ces produits en raison du secret industriel ([Kah, 2015](#)).

I.1.c Rejet et compartiments cibles des nanomatériaux en fin de vie dans l'environnement

Tout produit de consommation peut être altéré au cours de son utilisation. Il en résulte une dégradation et un éventuel relargage des constituants du produit ([Vance et al., 2015](#)). Les NMs peuvent ainsi être extraits du produit les contenant initialement. Il convient de comprendre la dynamique des NMs ainsi libérés dans l'environnement et l'impact qu'ils peuvent avoir sur les composantes de cet environnement. Cette dynamique va dépendre de plusieurs facteurs. L'inventaire de ces facteurs constitue en parti le cycle de vie, défini comme un outil permettant de déterminer les impact environnementaux d'un produit ou d'un service, depuis son développement, en passant par sa fabrication, jusqu'à la fin de son utilisation ([Hauschild et al., 2005](#)). L'argent (Ag) issu des NMs intégrés dans des vêtements est par exemple détectable dans les solutions de lavage ([Geranio et al., 2009](#)). L'argent libéré issu des NMs est en partie dissout. La fraction dissoute varie de 5 à 50% en fonction de la formulation des NMs d'argent. La fraction dissoute augmente avec l'ajout d'agents nettoyants, impliquant des conditions oxydantes. Néanmoins, l'argent libéré des textiles varie en fonction des produits exposés (une différence de 1 à 45% entre les produits). Les NMs peuvent également être émis directement dans l'environnement lors de leur utilisation. Le dioxyde de cérium (CeO₂) contenu dans les additifs diesel est retenu par les filtres à l'issue de la combustion du carburant dans les moyens de transports ([Ulrich and Wichser, 2003](#)). Mais une part des NMs peut être rejetée ([Batley et al., 2013](#)). Dans cette dernière étude, la combustion de suspensions NMs de CeO₂ avec des concentrations initiales de 3,5 µg.L⁻¹ et de 14 µg.L⁻¹, entraîne des résidus de combustion avec une concentration de 480 ou 1720 µg de Ce par gramme.

Des agrégats de NMs de dioxyde de titane (TiO₂) peuvent être observés dans des résidus de peintures ayant subi une altération ([Al-Kattan et al., 2014](#)). La peinture est étalée sur une surface plastique, détachée après 24 heures, broyée et exposée à des rayons ultraviolets dans une chambre climatique,

puis humidifiée et enfin mélangée à de l'eau ultra pure et laissée en sédimentation pendant 24 heures. Le surfactant est récupéré. Une part minoritaire du TiO_2 total y est visible (0,02%), et sous forme d'agrégat.

La connaissance des modes d'altération va permettre de quantifier les rejets et les compartiments cibles de l'environnement ([Keller et al., 2013](#)).

La [Figure 2](#) nous montre que les deux compartiments majoritairement concernés par le rejet des NMs sont les décharges et les sols. En ce qui concerne les sols, on remarque qu'il s'agit du premier compartiment cible de rejet du TiO_2 et le deuxième pour l'oxyde de zinc ZnO , le cuivre, l'argent et le dioxyde de cérium CeO_2 .

Les voies de transferts principales ont été estimées pour les principaux NMs produits ([Keller et al., 2013](#)). Les NMs de TiO_2 , Ag et CeO_2 sont rejetés majoritairement dans les sols par deux voies : directement après utilisation et dégradation des produits dans lesquels ils sont intégrés, ou bien via un traitement des eaux dans des stations d'épurations ([Blaser et al., 2008](#); [Kim et al., 2012](#); [Yang et al., 2014](#)). En effet, les boues de stations d'épurations, peuvent être récupérées pour un épandage en sol agricole, afin d'améliorer les propriétés physiques et la fertilité des sols ([Debosz et al., 2002](#)). Cet usage varie en fonction des pays et des législations. La Suisse interdit par exemple l'épandage ([Gottschalk et al., 2009](#)). Ces deux voies de rejet impliquent deux modes d'altération et des dynamiques différentes dans les sols ([Whitley et al., 2013](#)), ce qui peut entraîner des interactions et des degrés de toxicité différents avec le vivant. Les travaux de [Levard et al. \(2013\)](#) démontrent par exemple que la toxicité des NMs d'Ag va être modifiée par la concentration en chlorure. Une concentration plus importante en chlorure implique une toxicité plus faible pour *Escherichia coli*. La différence de salinité dans les milieux dans lesquels vont séjourner les NMs d'Ag pourra donc réguler sa toxicité pour les êtres vivants.

L'évaluation des risques liés au rejet des NMs doit également prendre en compte les concentrations auxquelles seront exposés les différents compartiments d'un écosystème. Dans le cas du rejet des NMs, leur utilisation est encore récente. Les premières estimations non exhaustives ont été effectuées en 2007 ([Boxall et al., 2007](#)). Les différentes estimations sont issues de modélisations se basant sur les quantités de NMs produites et leurs cycles de vie. Dans le cas de TiO_2 , CeO_2 , et Ag, les concentrations dans les sols agricoles ont été estimées d'après quatre études ([Gottschalk et al., 2015](#); [Liu and Cohen, 2014](#); [Park et al., 2008](#); [Sun et al., 2016](#)) et sont reportées dans la [Figure 3](#). Le graphique décrit la concentration des NMs dans les sols estimée, en fonction de l'année de publication.

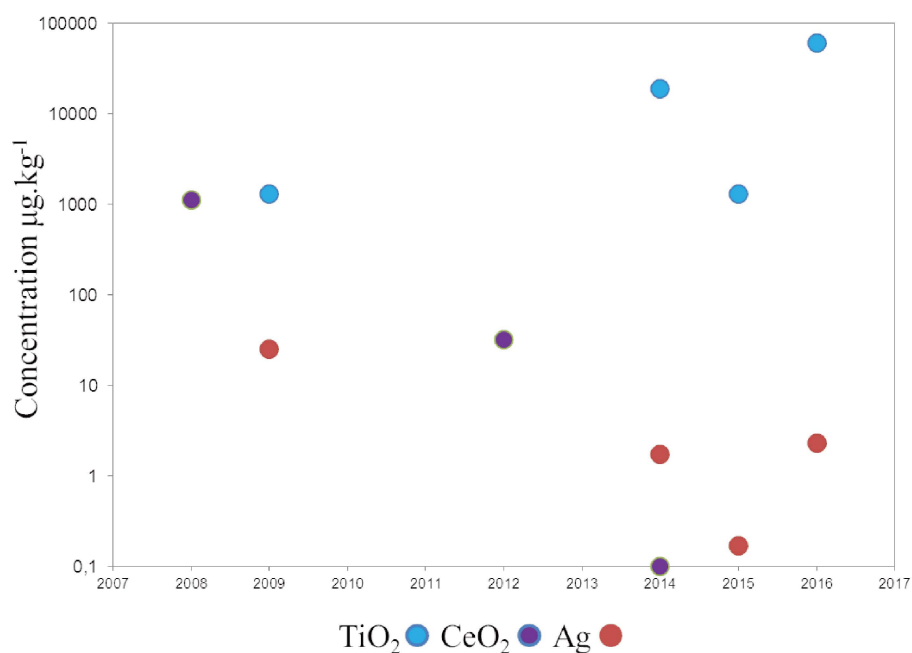


Figure 3 : Evolution des concentrations estimées de différents NMs dans les sols en fonction des années de publications (Gottschalk et al., 2015; Gottschalk et al., 2009; Johnson and Park, 2012; Park et al., 2008)

Les concentrations présentées dans la Figure 3 ne correspondent pas aux mêmes méthodes d'estimations. Dans le cas des Nms de CeO₂, la concentration dans les sols a été estimée successivement entre 0.32 et 1.12 mg.kg⁻¹ (Park et al., 2008) et 0.016 et 0.032 mg.kg⁻¹ (Johnson and Park, 2012). Ces deux études, menées par la même équipe, montrent une baisse de la concentration dans un sol en bordure des routes londoniennes. La première étude faisait une estimation des concentrations pour l'année 2020, en considérant que tous les véhicules utilisant du carburant diesel utilisaient également de l'additif contenant des NMs de CeO₂. Dans la deuxième étude, la prise en compte du marché des NMs a été plus précise, en estimant le nombre de véhicules utilisant réellement ces additifs (lignes de bus, modèles de voiture...). L'estimation varie en fonction de l'évolution de la consommation des NMs sur les cinq ans à venir à partir de 2012. Des travaux plus récents ont estimé concentrations des NMs dans des sols agricole, urbains, avec un épandage de boue de station d'épuration, (Gottschalk et al., 2015). Les concentrations estimées dans ces sols varient entre 76, 170 et 1500 ng.kg⁻¹. Ces concentrations ont été déterminées à partir d'une méthode probabiliste basée sur les travaux de Sun et al. (2014). Elle s'appuie sur la quantité de NMs produits dans différentes applications, et sur les flux de matière vers les différentes parties de l'environnement (sol, air, sédiments, eau, recyclage, etc...). Les quantités produites chaque année sont estimées à partir de projections de la consommation et de l'utilisation des NMs. Les flux sont déterminés par les différents travaux expérimentaux de la littérature. Dans le cas de CeO₂, si les travaux de 2008 et 2012 étaient concentrés sur les sols au bord des routes londoniennes, les valeurs estimées par Gottschalk et al. (2015) concernent l'environnement Danois.

Dans le cas de l'argent, les estimations présentées sont basées sur la même méthode ([Gottschalk et al., 2009](#); [Sun et al., 2016](#); [Sun et al., 2014](#)) On remarque une baisse de la concentration entre 2009 et 2014. Cette baisse est liée selon les auteurs à une meilleure connaissance du devenir des NMs et des réactions dans les différents compartiments concernés par les flux de matière.

Dans le cas du TiO_2 , les concentrations déterminées en 2009 ([Gottschalk et al., 2009](#)), 2014 et 2016 ([Sun et al., 2016](#); [Sun et al., 2014](#)) sont estimées au niveau de l'Union Européenne ou de la Suisse, contrairement aux estimations de 2015 qui ne concernent que le Danemark ([Gottschalk et al., 2015](#)). Les différences de concentration entre les trois études sont liées à une différence d'échelle d'étude, et à une différence de temps d'accumulation. [Sun et al. \(2014\)](#) ont estimé une accumulation basée sur la production de NMs à partir de l'année 2008. On en déduit une production, et une accumulation annuelle dans certains compartiments de l'environnement. [Sun et al. \(2016\)](#) ont estimé une accumulation dans les sols de 1990 à 2020, en prenant une année de production de référence : 2012. La production de TiO_2 de 2012 est ensuite modifiée en fonction de l'année de production par un facteur d'échelle propre à cette année. Ce facteur est basé sur le fait que la production des NMs est proportionnelle au développement des nanotechnologies. Cet indice est estimé, entre autre, par la projection des marchés des nanotechnologies, l'analyse des brevets, et des données sur les quantités produites. Nous pouvons souligner ici qu'au cours des années, la connaissance de l'implication des NMs dans les produits de la vie courante s'est amélioré ([Caballero-Guzman and Nowack, 2016](#); [Johnson and Park, 2012](#)), ainsi que les connaissances concernant les processus d'altération des produits. Ces connaissances permettent de réévaluer fréquemment les concentrations des NMs dans les différents compartiments de l'environnement.

I.1.d Dynamique des nanomatériaux dans les sols

Une fois libérés dans un compartiment cible, il est fondamental de caractériser les interactions entre les NMs et leur environnement.

Le sol est un milieu complexe. Les propriétés physico-chimiques peuvent être décrites en fonction de trois phases constituant le sol : les phases gazeuses, liquides et solides ([McKee and Filser, 2016](#); [Stepniewski et al., 2002](#)). Les interactions entre le sol et les NMs se retrouvent principalement dans les phases liquides et solides. Nous allons donc décrire la dynamique des NMs dans ces deux dernières phases du sol.

I.1.d.i Transformation physico-chimique des NMs en milieu aqueux

Différentes réactions chimiques ou physiques comme l'oxydation ou la réduction, l'homo ou hétéroaggrégation ([Lowry et al., 2012b](#); [Mitrano et al., 2015](#)) contrôlent la dynamique des NMs dans les sols. Ces réactions mettent en jeu des interactions avec des composés inorganiques ou organiques, et sont synthétisées dans la [Figure 4](#).

Elles dépendent de différents facteurs physico-chimiques tels que le pH, la nature des molécules organiques, ou la force ionique de la solution ([Omar et al., 2014](#)).

Interactions with Macromolecules

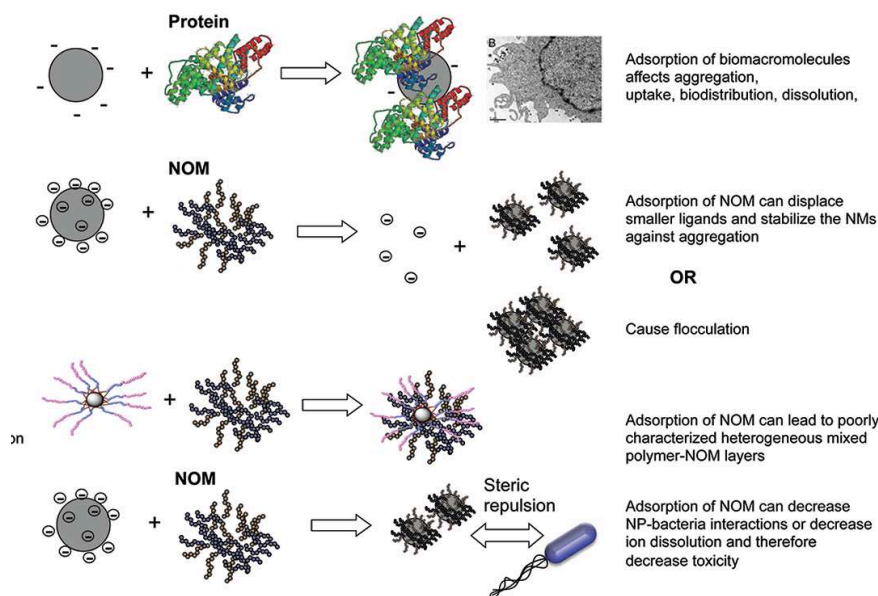


Figure 4 : Synthèse des différentes interactions possibles des NMs avec des macromolécules (NOM : Natural Organic Matter) ([Lowry et al., 2012b](#)).

La dissolution implique la séparation d'atomes d'une particule et leur libération en solution ([Wiesner and Bottero, 2016](#)). Dans le cas des NMs, ce phénomène peut être plus important par rapport au matériau massif. En effet, il a été démontré que la dissolution est favorisée lorsque l'énergie de surface d'une particule augmente ([Ma et al., 2012](#)). Les différentes modalités de la dissolution des NMs sont résumées dans la [Figure 5](#).

La dissolution peut être issue d'une oxydation d'un métal zérovalent (Fe^0).

Elle peut également être liée à des ligands inorganiques. La dissolution de l'argent peut être favorisée suite à l'adsorption de l'ion chlorure (Cl^-), lorsque le ratio Ag/Cl dépasse un seuil critique ([Levard et al., 2013](#)).

La dissolution peut également se produire dans le cas de réduction d'oxydes. On peut citer l'exemple des NMs de CeO_2 (le cérium passe d'un état d'oxydation Ce^{IV} à Ce^{III}). On obtient des ions Ce^{3+} en solution.

L'adsorption de ligands inorganique peut limiter la dissolution des NMs. C'est le cas des NMs d'argent qui peuvent former en surface des complexes Ag_2S ([Lowry et al., 2012b](#)). Cette sulfuration va limiter l'oxydation et donc l'éventuelle dissolution du métal ([Lowry et al., 2012b](#)). Les NMs de ZnO peuvent également être remplacé par sulfuration par ZnS . Malgré la toxicité éventuelle pour les organismes, de certains ions libérés comme l'argent ([Anjum et al., 2013](#)), la dissolution implique une perte des propriétés spécifiques des NMs ([Mitrano et al., 2015](#)).

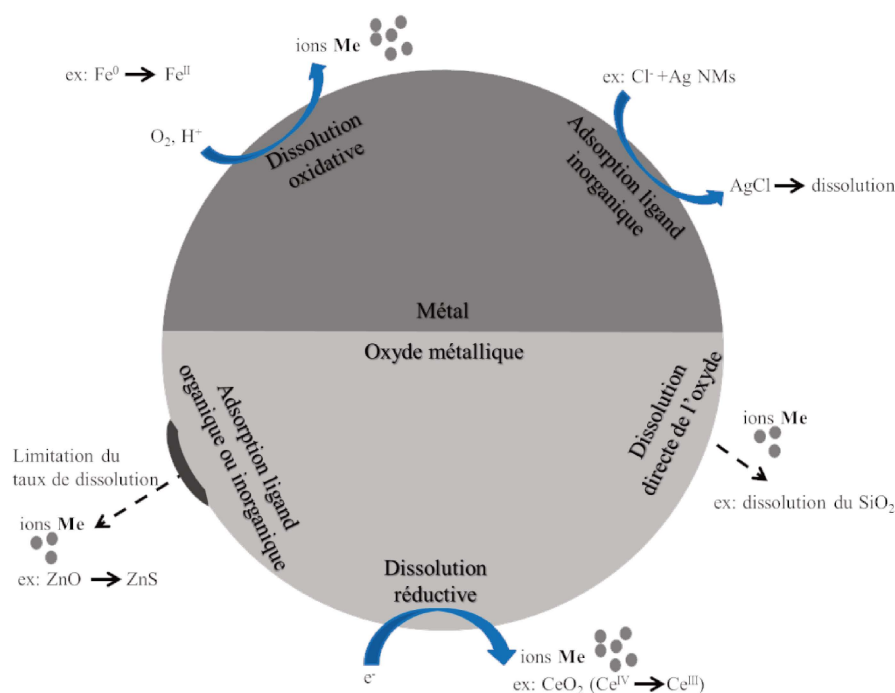


Figure 5: Illustration des différentes modalités de dissolution des NMs de métaux (Me) et d'oxyde métallique (MeO_x), d'après (Wiesner and Bottero, 2016)

L'état d'agrégation est un autre facteur pouvant modifier la dynamique des NMs dans les sols. Lorsque les particules agrégées sont de même nature, il s'agit d'homoagrégation, lorsqu'elles sont différentes il s'agit d'hétéroagrégation.

L'agrégation est définie comme l'association de particules qui forment des agrégats (clusters) (Elimelech et al., 1995). Elle dépend principalement de deux conditions. Premièrement, les deux particules doivent se déplacer de sorte que la collision entre elles ait lieu. Deuxièmement, la collision doit impliquer la formation d'un contact permanent entre les deux particules. L'agrégation est principalement régie par les propriétés de surface des particules (Stumm and Morgan, 1996). Comme le montre la Figure 6, la charge de surface de deux particules (positive, neutre ou négative) va déterminer la barrière énergétique à dépasser pour former un agrégat (théorie de la DLVO) (Baalousha, 2009). La variation de la barrière énergétique induit donc une modification de l'état d'agrégation. Si la barrière d'énergie potentielle augmente, deux particules auront plus de difficultés à s'agréger. Il convient donc d'analyser comment cette barrière est modifiée par des paramètres physico-chimiques du sol tels que le pH et les matières organiques dissoutes.

Le pH modifie la charge de surface des particules, il est donc possible d'atteindre le point de charge nulle, pH auquel les charges de surface sont neutres. La barrière énergétique est donc abaissée et l'agrégation est favorisée. Plus le pH s'éloigne du point de charge nulle, plus la barrière énergétique est élevée (Figure 6a).

Les matières organiques dissoutes sont également responsables d'une modification de l'état d'agrégation. Comme le rappelle la Figure 4, les NOM (Natural Organic Matter) peuvent s'adsorber

sur les particules et modifier ainsi la charge de surface. Des acides organiques adsorbés, en fonction de leur nature, vont modifier le point de charge nulle ([Baalousha, 2009](#)). Cet effet est visible dans la [Figure 6b](#) puisque la barrière énergétique est abaissée en présence d'acide organique. La matière organique dissoute dans les sols limite donc l'agrégation et stabilise les particules en abaissant le point de charge nulle à des valeurs de pH inférieures à celles généralement rencontrées dans les sols. Dans le cas du Fer ([Baalousha, 2009](#)), le point de charge nulle passe de pH=7,5-8 à 4. Cette stabilisation est également visible pour les NMs de CeO₂ ([Quik et al., 2010](#)), TiO₂ ([Loosli et al., 2013](#)), et Ag ([Cumberland and Lead, 2009](#); [Delay et al., 2011](#)).

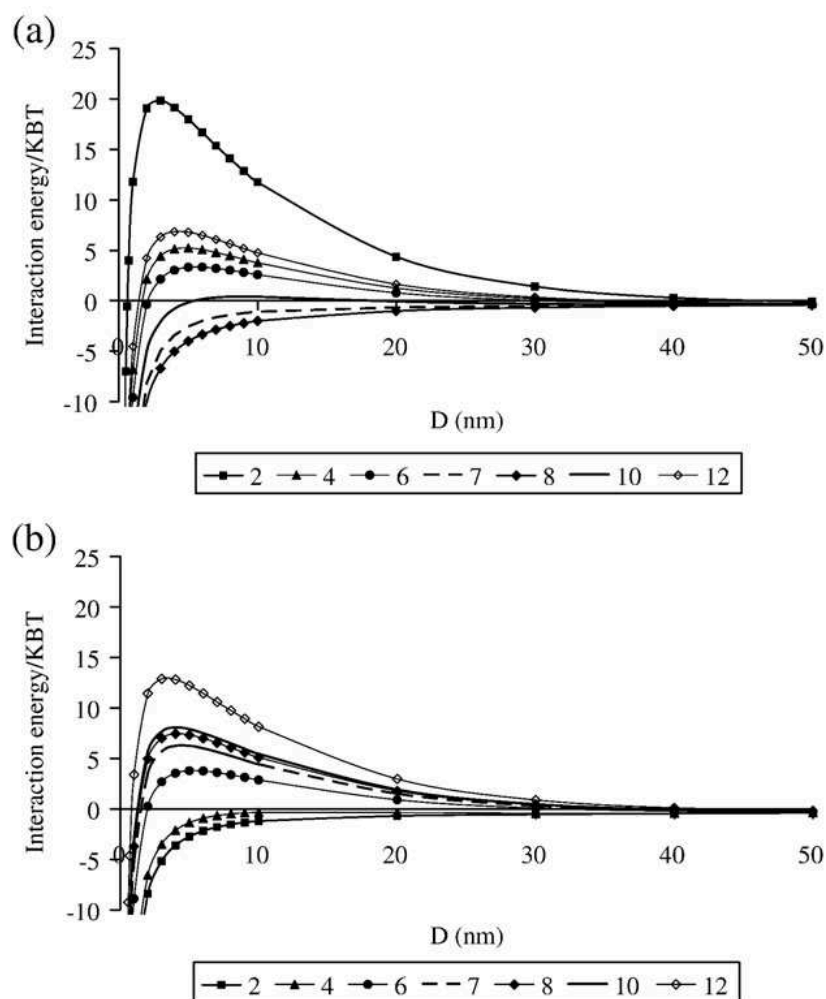


Figure 6 : Energie potentielle entre deux particules de fer en fonction de la distance entre les deux particules. Les résultats varient en fonction des pH (12, 10, 8, 7, 6, 4, 2), en l'absence d'acide humique (a) ou avec 100 mg.L⁻¹ d'acide humique (b) ([Baalousha, 2009](#))

Dans les sols, on s'attend à ce que l'hétéroagrégation soit favorisée par rapport à l'homoagrégation étant donné l'abondance en matière organique, en argile, et la faible concentration en NMs. De plus, en fonction de la concentration en ions divalents (Ca²⁺ ou Mg²⁺), l'hétéroagrégation entre les NMs et les constituants du sol est favorisée ([Chen and Elimelech, 2007](#)) par la formation de ponts ioniques entre les molécules ([Figure 7](#)). Dans le cas d'ions monovalents, même en étant proches de la

concentration critique de coagulation la matière organique est au contraire en mesure de stabiliser les NMs (Figure 7).

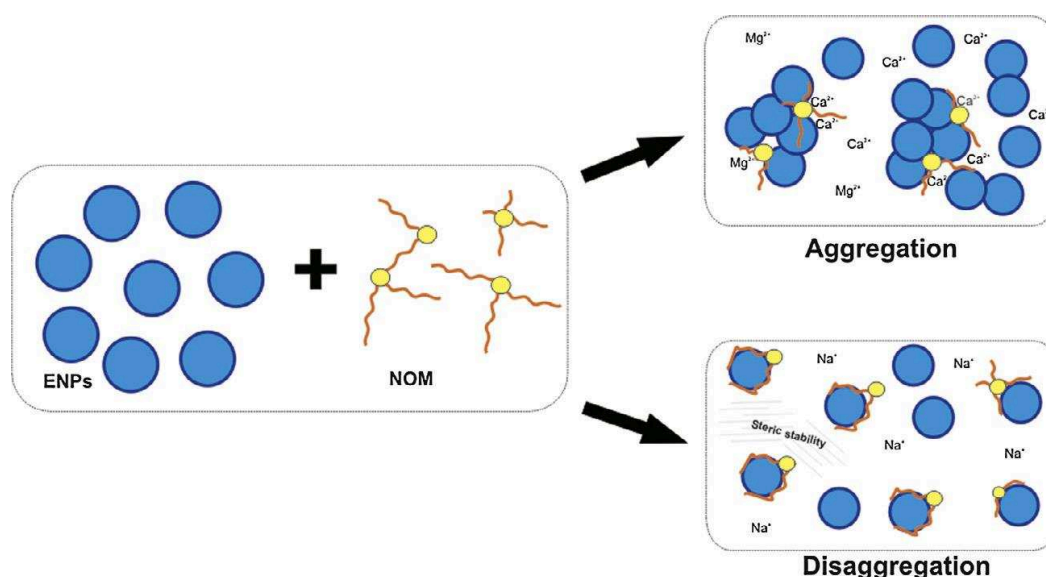


Figure 7 : Modification de la stabilité des NMs en fonction de la matière organique et des ions monovalents et divalents (Grillo et al., 2015)

L'hétéroaggrégation est majoritaire en présence d'argile par rapport à l'homoaggrégation lorsque les charges des particules sont opposées. Si nous prenons l'exemple de NMs de TiO₂, les auteurs détectent principalement une hétéroaggrégation, à pH=5. Les auteurs observent également que lorsque les charges de surfaces sont négatives (pH=8), l'aggrégation n'est pas détectée dans un mélange argile (smectite) et NMs. Dans le même temps, à pH=5, l'ajout d'acide humique (1mg.L⁻¹) réduit l'hétéroaggrégation par adsorption à la surface des NMs et des argiles de la matière organique, ce qui limite les interactions entre les deux particules.

Afin de stabiliser les NMs dans les produits, les procédés incluent l'enrobage des NMs avec différentes molécules (citrate, PVP, SiO₂ etc.). Comme dans le cas des acides humiques, ils permettent notamment de limiter l'homoaggrégation des particules, ce qui permet de conserver des NMs stables dans le produit.

Cependant, la nature et le devenir de l'enrobage dans l'environnement est un élément à prendre en compte dans l'évaluation de la dynamique des NMs. Dans l'étude de Whitley et al. (2013), la concentration en argent (comprenant l'argent dissous et non dissous) dans la solution du sol est plus importante lorsque les NMs d'argent sont enrobés de citrate par rapport à un enrobage de PVP (polyvinylpyrrolidone). Cette différence n'est visible que pour une mise en contact entre les NMs et les sols d'une semaine. La différence n'est plus visible pour une mise en contact plus longue.

Les auteurs suggèrent que cette différence peut être liée à une plus grande affinité de l'enrobage PVP pour la phase solide du sol que l'enrobage citrate. La différence entre les deux types d'enrobage n'est

plus significative au-delà d'une semaine, ce qui peut être expliqué par un progressif remplacement des molécules d'enrobage par la matière organique dissoute des sols sur les particules, homogénéisant les interactions avec le sol.

Dans le cas de NMs de CeO_2 , [Zhao et al. \(2012\)](#) ont mis en évidence que la concentration en Ce (filtration à 5-10 μm , pour laisser passer également les particules) dans la solution du sol était plus importante lorsque les NMs de CeO_2 avaient un enrobage d'alginate. Cette différence n'était plus significative lorsque le sol était enrichi en matière organique. Là encore, les auteurs soulignent que la présence de matière organique dissoute augmente la mobilité des NMs, ce qui peut atténuer l'impact de l'enrobage.

Les changements de spéciation et de l'état d'agrégation des NMs du fait des interactions avec les matières organiques ou inorganiques du sol ont également un effet prépondérant sur leur rétention par la phase solide du sol.

I.1.d.ii Rétention et transport des nanomatériaux par la phase solide du sol

Les déterminants du transport des NMs dans les sols sont proches de ceux mis en évidence pour les colloïdes. La définition des colloïdes englobe celles des matériaux tels que les argiles, oxydes métalliques, particules organiques etc... ayant une dimension comprise entre masse supérieur à 10 kDa et une dimension inférieur à 0,45 μm ([Sigg et al., 2000](#); [Stumm, 1977](#)). Le transport en milieu poreux des colloïdes apporte donc des informations sur la dynamique des NMs ([Cornelis et al., 2014](#)). Les différentes parties composant la rétention et le transport d'un NMs sont synthétisées dans la [Figure 8](#).

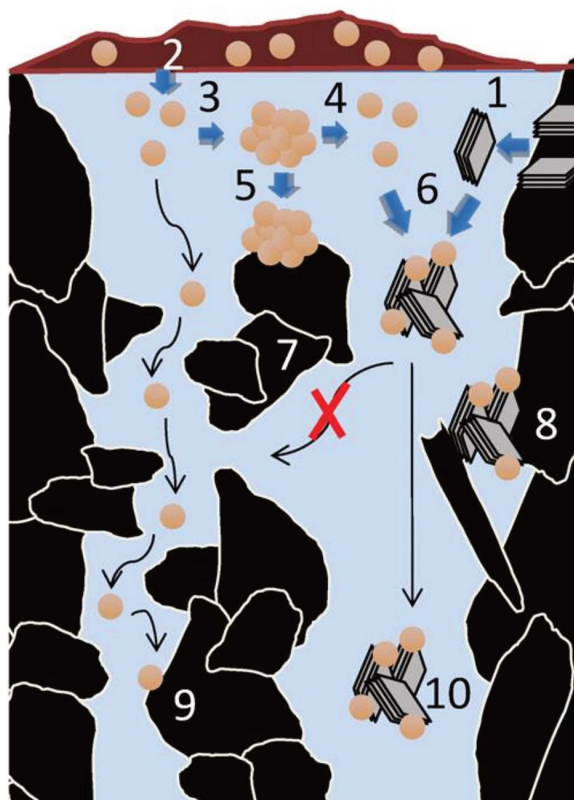


Figure 8 : Illustration des différents phénomènes composant le transport et la rétention des NMs dans le sol: 1 formation des colloïdes, 2 lessivage des NMs, 3 homoagrégation, 4 désagrégation, 5 sédimentation, 6 hétéroagrégation, 7 filtration par la taille, 8 rétention, 9 dépôt, 10 transport par convection ([Cornelis et al., 2014](#))

La rétention des NMs dans les sols est expliquée par plusieurs mécanismes décrits dans la [Figure 8](#). L'homoagrégation peut induire une sédimentation sur la phase solide du sol ([Figure 8](#), phénomène 5). La rétention évolue en fonction de la granulométrie des sols et a tendance à être élevée lorsque la teneur en argile (particules du sol ayant une taille inférieure à 2 μm) est importante. Les travaux de [Cornelis et al. \(2011\)](#) et de [Cornelis et al. \(2012\)](#) ont ainsi mis en évidence que la rétention des NMs de CeO_2 et d'Ag est positivement corrélée avec la teneur en argile des sols. L'[Équation 1](#) permet de voir que le taux d'argile est l'un des facteurs prépondérants dans la rétention des NMs.

<p>a</p> $\log K_{r, \text{CeO}_2} = -3,96 + (0,038 \times \% \text{argile}) - 0,4262 \times \log[\text{PO}_4] + 0,3 \times \text{pH}$ <p>$r^2 = 0,72$</p>	<p>b</p> $\log K_{r, \text{Ag}} = 2,04 + (0,025 \times \% \text{argile})$ <p>$r^2 = 0,67$</p>
---	--

Équation 1: Equation décrivant la rétention des NMs de CeO_2 (a) et d'argent (b) dans les sols. K_r : coefficient de rétention des NMs, %argile: taux d'argile dans les sols (en pourcentage), r^2 : coefficient de corrélation. D'après [Cornelis et al. \(2012\)](#), et [Cornelis et al. \(2012\)](#).

Comme nous l'avons vu avec la théorie de la DLVO, l'adsorption d'acides organiques abaisse la charge de surface des particules et stabilise les particules. Or, dans un sol, les argiles ont une charge de

surface négative ([Cornelis et al., 2011](#); [Kosmulski, 2009](#)). La rétention des NMs enrobés de matière organique ou de phosphates par les argiles sera donc dépendante du pH du sol. Ce pH peut être modifié, par exemple grâce à l'activité biologique.

Le transport des NMs, par leur mise en suspension dans la solution du sol, peut être causée par la dégradation de la matière organique issue des boues de station d'épuration dans lesquelles sont intégrées les NMs ([Cornelis et al., 2014](#)). La mise en suspension est également liée à un phénomène d'adsorption de molécules pouvant modifier la charge de surface et donc l'interaction des NMs avec la phase solide du sol. Les molécules de phosphate peuvent par exemple enrober et limiter la rétention de NMs de TiO₂ ([Chen et al., 2015](#)). L'adsorption des matières organiques dissoutes peut induire l'inhibition ou l'augmentation des interactions entre les NMs et les colloïdes ([Cornelis et al., 2014](#)). Dans le cas où l'adsorption des matières organiques dissoutes inverse le signe de la charge de surface des NMs, l'adsorption sur la phase minérale des sols peut être limitée ([Jones and Su, 2012](#); [Zhao et al., 2012](#)).

Les phénomènes d'homo/hétéroagrégation peuvent mener à des résultats contradictoires en termes de mobilité des NMs. Cet effet est illustré par la [Figure 8](#) (phénomène 7). Le transport à travers les macropores est plus facile qu'à travers les pores de plus petites tailles ([Cornelis et al., 2014](#)). L'augmentation de la taille des particules peut favoriser le phénomène de rétention ([Figure 8](#), phénomène 8). De plus, le régime hydrique d'un sol varie en fonction des conditions météorologiques. Dans un sol insaturé, les macropores constituent la première partie du sol à être drainée. Le transport des particules va donc être réduit par rapport aux particules présentes dans les pores de plus petites tailles, moins soumises aux changements de régime hydrique ([Cornelis et al., 2014](#)).

Suite aux différentes transformations et régulations dans le sol, les NMs vont interagir avec la plante. Leur absorption va être conditionnée par des paramètres liés aux propriétés de la plante. Nous allons préalablement décrire les différentes composantes de la phytodisponibilité d'un élément, puis nous nous concentrerons sur les modalités propres à la disponibilité des NMs.

I.2 Le Concept de phytodisponibilité

Etudier l'impact de polluants implique de déterminer leur disponibilité pour des organismes. La disponibilité des polluants dans le cas d'organismes végétaux, se définit par le concept de phytodisponibilité. Cette disponibilité est la résultante de trois phases dynamiques de transport d'un élément vers l'organisme. La première phase est une désorption de l'élément via des processus physico-chimiques depuis un compartiment environnemental jusqu'à la solution de sol, c'est la disponibilité environnementale. La seconde phase, appelé biodisponibilité environnementale, est le prélèvement de l'élément par l'organisme, dépendant de processus physiologiques. Enfin, la dernière

phase concerne les conséquences physiologiques de l'élément absorbé, il s'agit de la biodisponibilité toxicologique ([Lanno et al., 2004](#); [Peijnenburg et al., 1997](#)).

I.2.a Disponibilité environnementale

L'unique information de la concentration d'un élément dans les sols ne permet pas de considérer la quantité du polluant à laquelle est exposé un organisme ([Kim et al., 2015](#)). La quantité disponible représente une partie de l'élément dans le sol. Dans le cas des métaux, la disponibilité environnementale peut se définir comme la fraction du contaminant potentiellement disponible pour des organismes et qui résulte de processus physico-chimiques de désorption ([ISO 2006](#)). La fraction disponible dans les sols peut être mesurée par des protocoles d'extraction. En revanche, la mesure de la fraction dissoute extraite dans la solution du sol ne représente pas la fraction disponible. Il a été démontré que les métaux disponibles pour la plante sont également issus de complexes avec des ligands organiques (matières organiques dissoutes) ou inorganiques ([Nolan et al., 2005](#)). Cet aspect souligne l'importance de la spéciation dans l'évaluation de la disponibilité environnementale ([Kabata-Pendias, 2000](#)).

Dans le cadre des NMs, l'évaluation de la spéciation de l'élément est essentielle. Comme nous l'avons montré dans la [Figure 5](#), les NMs, une fois en solution, sont sujets à des phénomènes d'oxydation, de dissolution ou de complexation. Les facteurs déterminant la disponibilité environnementale ont été décrits dans la [partie I.1.d](#).

I.2.b Biodisponibilité environnementale

La biodisponibilité environnementale peut être décrite, dans le cas des plantes, comme la quantité d'un élément prélevée par la plante par des processus d'absorption ou d'adsorption ([ISO-11074-1, 2004](#)). Cependant, cette définition ne prend pas en compte le temps d'exposition de la plante au polluant. Ce facteur est considéré comme essentiel pour évaluer la biodisponibilité environnementale ([Harmsen et al., 2005](#)), car elle peut se définir comme un flux de l'élément dans la plantes, ce qui implique une temps d'exposition défini. Le prélèvement d'un élément peut aussi dépendre des propriétés physiologiques de l'organisme et de son stade de développement ([Kabata-Pendias, 2000](#); [Kim et al., 2015](#)). Dans le cas des plantes, le prélèvement d'un métal peut se faire de manière passive (flux à travers les membranes cellulaires), ou actif (prélèvement par des peptides). Le terme de prélèvement d'un élément par la plante est composé de trois mécanismes : i) l'adsorption (l'élément interagit avec les parois cellulaires de la racine, ou avec la surface de la membrane plasmique), ii) l'absorption (l'élément passe à travers la membrane plasmique), iii) et la translocation (transfert de l'élément depuis le compartiment racinaire, vers le compartiment aérien de la plante). La mesure de la phytodisponibilité n'est pas simple. En effet, la difficulté réside dans l'estimation d'une valeur à un instant donné, sachant que celle-ci peut évoluer au cours du temps, comme précisé précédemment.

Une mesure de la concentration de l'élément dans la plante (en mg.kg^{-1}) a été proposée ([Kim et al., 2015](#)). Néanmoins, ceci ne permet pas d'apprécier l'évolution du prélèvement en fonction du temps. La mesure du flux semble donc plus approprié ([Shor and Kosson, 2000](#)), mais elle est plus difficile à mettre en place. Une mesure à un instant donné, intégrée sur une durée connue de prélèvement pourrait être utilisée mais ne permet pas de déterminer l'évolution du prélèvement en fonction du temps.

I.2.c Biodisponibilité toxicologique

La biodisponibilité toxicologique pour une plante se définit comme la bioaccumulation d'un élément, et la toxicité qui en découle. Les effets toxiques liés à l'accumulation peuvent se manifester au niveau d'un compartiment de la plante comme les racines (rhizotoxicité), au niveau cellulaire (cytotoxicité), et au niveau métabolique (génétoxicité). Si l'accumulation des éléments a été étudiée dans cette thèse, aucun paramètre de toxicité n'a été mesuré lors des expositions avec les différents traitements.

I.3 Anatomie, morphologie et physiologie de la racine

Comme nous l'avons vu, la biodisponibilité environnementale peut être définie comme le flux d'un élément associé et/ou prélevé par la plante. La racine est une ramification souterraine servant à maintenir la plante dans le sol et à la nourrir. C'est un organe composé de plusieurs compartiments, hétérogènes en termes de structure et de composition chimique, qui évolue au fur et à mesure de sa croissance.

Nous nous intéresserons dans ce chapitre aux plantes vasculaires à fleurs appartenant à la classe végétale des angiospermes. Cette classe comprend les principales plantes d'intérêt économique, représentant entre 50 et 90% du volume de la nourriture humaine ([Serban et al., 2008](#)). Les angiospermes sont divisées en deux sous classes, les monocotylédones (blé, maïs, luzerne...) et les dicotylédones (tomate, concombre, *Arabidopsis thaliana*). Il convient, avant tout de décrire l'unité structurelle des racines qu'est la cellule. Dans le cas des cellules végétales, la membrane plasmique est entourée d'une paroi rigide qui donne leur forme aux cellules. Cette paroi est constituée de polysaccharides de structure comme la cellulose et l'hémicellulose (xylanes chez les monocotylédones, xyloglucanes chez les dicotylédones), de pectines ainsi que de protéines (dont les enzymes) et glycoprotéines ([Keegstra, 2010](#)). Sa composition et son épaisseur évolue en fonction du type de cellules et du stade de développement ([Somssich et al., 2016](#)). Les cellules en division et en croissance ont des parois primaires fines et extensibles. Lors de l'arrêt de la croissance, la paroi peut subir des modifications incluant des polymères additionnels comme la lignine, un réseau de composés phénoliques. Cette matrice constituant un espace entre les cellules, peut servir de voie de passage des éléments à travers la racine et est appelée apoplasme. Les éléments absorbés peuvent également

circuler dans l'appareil racinaire de cellules en cellules, reliées entre elles par le plasmodesme. Cette voie de passage est appelée symplasme.

Lorsque les NMs vont être prélevés par la plante, ils vont interagir, à mesure de leur progression, avec des interfaces différentes. Tout comme nous l'avons fait avec les différents paramètres physico-chimiques du sol, nous allons étudier la structure dans laquelle sont susceptibles d'évoluer les NMs.

Les différentes parties de la racine sont décrits dans la [Figure 9](#).

L'extrémité de la racine est délimitée par la coiffe. Cet ensemble de cellules recouvre le méristème apical. Les cellules de la coiffe se développent et sont renouvelées en continue lors de la croissance racinaire ([Arnaud et al., 2010](#)). Les cellules constituant la coiffe ont une activité métabolique spécifique, permettant de synthétiser un mucilage composé de divers polysaccharides ([Rougier, 1981](#)). Cette synthèse permet notamment une meilleure pénétration de la racine dans le sol ([Arnaud et al., 2010](#)). Il joue également un rôle de protection en complexant certains métaux essentiels comme le cuivre ([Deiana et al., 2003](#)), ou non essentiels comme l'aluminium ([Horst et al., 1982](#)). Le méristème apical comprend une zone de cellules en division où les cellules ne sont pas encore différenciées (spécialisées) encadrées par un centre quiescent et une zone d'entretien des cellules de la coiffe. La zone d'élongation correspond à la partie de la racine où les cellules ne se divisent plus et commencent à s'allonger. Dans la zone de différenciation, les cellules acquièrent une spécialisation physiologique pour former des tissus différents.

Le rhizoderme constitue une première couche protectrice pour séparer la racine du milieu extérieur. Il est présent dans les racines jeunes. Lorsque les éventuelles structures secondaires s'élargissent, l'épiderme se dégrade et laisse place à une couche plus rigide, le suber. Ce tissu est composé de cellules mortes, avec une paroi cellulaire contenant de la subérine ([Graça and Santos, 2007](#)).

Le parenchyme cortical est une zone d'accumulation de réserves dans les vacuoles des cellules. Ces dernières sont entourées d'une paroi pectocellulosique. Cette matrice principale permet de maintenir la structure de la racine ([Somssich et al., 2016](#)) et est constituée de pores. Une première taille des pores a été estimée et comprise entre 3 et 5 nm ([Carpita et al., 1979](#)). Ce résultat fut considéré comme sous-estimé à cause du protocole expérimental ([Tepfer and Taylor, 1981](#)). La solution hypertonique utilisée peut induire une baisse de la taille des pores de la paroi. Des mesures plus récentes permettent d'estimer la taille des pores comprises entre 10 et 20 nm ([Mccann et al., 1990](#)). La taille peut augmenter entre 30 et 40 nm. Lorsque la pectine est extraite de la paroi cellulaire, la taille des pores peut atteindre 60 nm ([Mccann et al., 1990](#)). Lorsque l'hémicellulose est extraite, la taille peut augmenter jusqu'à 100 nm. La différenciation des tissus racinaires en fonction du temps va donc réguler la porosité de la paroi.

L'apoplasme a une constante d'acidité (pKa) comprise entre 3 et 3,6. Lorsque le pH est supérieur à 4-4,5, 80% des groupements fonctionnels dans l'apoplasme sont dissociés ([Allan and Jarrell, 1989](#)), ce qui permet d'absorber des cations métalliques, par des interaction électrostatiques ou des adsorptions spécifiques ([Allan and Jarrell, 1989](#); [Dufey et al., 2001](#)). Cette propriété est quantifiée par la capacité

d'échange cationique racinaire (CECR). Elle peut varier en fonction des sous classes de plante, qui n'ont pas la même concentration en acides uroniques ([Dufey et al., 2001](#)). Les dicotylédones présentent une concentration plus importante que les monocotylédones, impliquant une capacité d'échange cationique plus importante pour les dicotylédones ([Dufey et al., 2001](#)). La sous classe de la plante peut donc avoir une influence sur la phytodisponibilité de différents éléments compris dans le sol.

L'endoderme permet de transférer les éléments vers le système vasculaire (xylème et phloème) de la plante. Les cellules sont cependant bordées par le cadre de Caspary ([Andersen et al., 2015](#)). Il s'agit d'une barrière lipidique entourant les cellules de l'endoderme. Ce cadre n'est pas présent dans les cellules plus jeunes, proches de la coiffe. Le profil du cadre est différent entre les monocotylédones et les dicotylédones ([Figure 9](#)). Ce cadre permet de limiter le flux des éléments vers le système vasculaire de la plante. Si dans un premier temps, le cadre est constitué de lignine, il se recouvre progressivement de subérine avec le temps ([Andersen et al., 2015](#)). La lignine constitue un rempart physique à l'eau et aux solutés, induisant une modification de la voie de transport des éléments. Cette fonction n'est pas corrélée entièrement à l'ajout de subérine, son rôle n'est donc pas encore précisé.

La stèle constitue le cylindre central de la racine comportant les tissus conducteurs du système vasculaire. Parmi les composants de ce cylindre, les faisceaux constituent une voie de transfert de l'eau, et des sels minéraux via le xylème, et de substances organiques élaborées (glucides) via le phloème depuis les racines vers les cellules des parties aériennes. Ces tissus sont formés de cellules avec une paroi lignifiée ([Peterson and Cholewa, 1998](#)). Ceci permet un support rigide de la structure subissant une pression lors du transfert de la sève ([Barnabas, 1991](#)) par combinaison de la poussée racinaire et de l'évapotranspiration.

La racine peut, au niveau du rhizoderme, développer des poils absorbants pour favoriser l'absorption de solutés. Ils permettent d'augmenter la surface d'interaction entre la racine et le sol ([Haling et al., 2013](#)). Ils peuvent représenter jusqu'à 80% du prélèvement du phosphore de la plante ([Jungk, 2001](#)). Les poils absorbants sont formés à partir des trichoblastes, qui sont des cellules étendues situées à la surface du rhizoderme ([Dolan et al., 1993](#)). La croissance est suivie par le développement d'une paroi pectocellulosique recouvrant les cellules ([Dolan, 2001](#)). La taille des pores dans la paroi peut être plus importante qu'au niveau du parenchyme et atteindre 100 nm environ ([Galway, 2006](#)). Au niveau de l'endoderme, peuvent se différencier des racines secondaires, qui vont passer à travers le cadre de Caspary, le parenchyme et le rhizoderme. La rupture temporaire des tissus peut constituer une voie de passage facilitée des éléments extérieurs à la racine ([Geisler-Lee et al., 2014](#)).

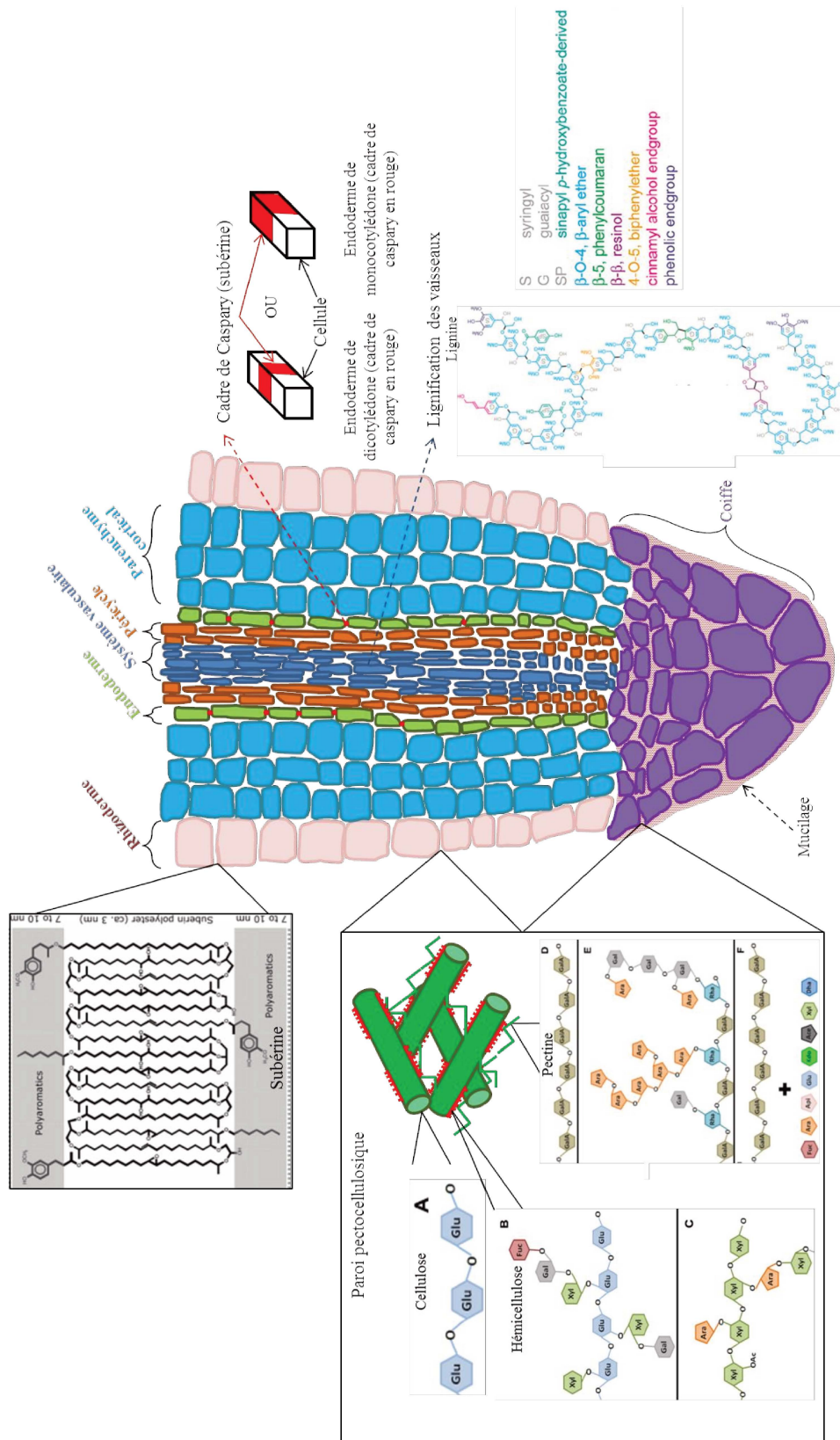


Figure 9: Répartition des différents tissus racinaires et composition des différentes matrices extracellulaires. Schéma de racine issu de Dolan et al. (1993). Composition chimique de la subérine d'après (Graça and Santos, 2007). Composition chimique de la paroi pectocellulosique d'après (Somssich et al., 2016). Composition chimique de la lignine d'après (Vanholme et al., 2010). Glu : glucose ; Xyl : xylose ; Gal : galactose ; Fuc : fucose ; Ara : arabinose ; Acide galacturonique : GalA ; Apiose : Api ; Acide ulosonique : Kdo ; acide O-acetyl-L-aceric acid : Ace ; Acide heptulosarique : Dha

I.3.a Transport racinaire des éléments

Le mouvement de soluté à travers la racine peut être décrit selon trois mécanismes qui sont résumés dans la [Figure 10](#). Le premier mouvement est symplasmique. Les éléments, une fois intégrés dans les cellules se déplacent à travers elles jusqu'à l'endoderme grâce au plasmodesme, qui permet une continuité cytoplasmique entre les cellules racinaires. Le flux des éléments à travers le plasmodesme est dépendant de ses dimensions, qui sont régulées par la synthèse de callose ([Schulz, 1995](#); [Zavaliev et al., 2011](#)). Le nombre de plasmodesmes entre les cellules va dépendre de l'espèce de la plante et des tissus racinaires ([Roberts and Oparka, 2003](#)). La membrane plasmique constitue donc une première barrière de sélectivité des éléments. Une fois intégrés dans la cellule, ils peuvent encore être retenus par des réactions de chélation ou d'intégration dans la vacuole ([Barberon and Geldner, 2014](#)).

Le deuxième mouvement est apoplasmique. Les différents éléments peuvent diffuser par transport passif dans l'apoplasme, formé par les parois pectocellulosiques et les espaces vides entre les cellules végétales. Comme nous l'avons précisé précédemment, l'endoderme limite le passage de soluté par la voie apoplasmique vers le xylème grâce au cadre de Caspary. De l'endoderme vers le xylème, les éléments sont forcés de passer d'une cellule à l'autre par voie symplasmique.

Il existe un troisième mode de transport, le transport trans-cellulaire ([Barberon and Geldner, 2014](#)). Les éléments suivent un flux et un efflux dans les cellules racinaires ([Figure 10](#)). Ce mode de transport implique des mécanismes de transporteurs des ions pour être intégrés et expulsés des cellules.

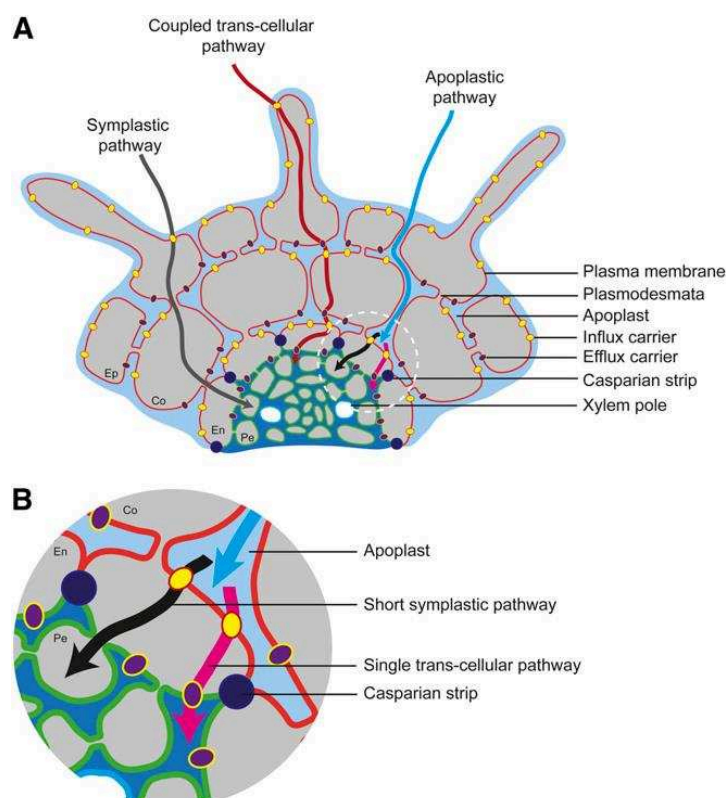


Figure 10: Transport des éléments nutritifs dans les racines. Figure issue de [Barberon and Geldner \(2014\)](#). La partie A représente les différents modes de transport des éléments depuis le sol jusqu'à l'endoderme. La partie B se concentre sur les modes de transport des éléments entre le parenchyme cortical et l'endoderme.

I.3.b Mécanisme d'absorption des éléments dans les cellules racinaires

Les éléments nutritifs ou métaux dissous sont intégrés dans les cellules par différents moyens qui sont résumés dans la [Figure 11](#).

Les transporteurs peuvent avoir une affinité variable pour différents métaux ([DalCorso et al., 2014](#)). Il existe également plusieurs transporteurs pour un même élément. Les transporteurs peuvent être divisés en deux catégories différentes : ceux pour l'intégration des métaux dans le cytosol (influx), et ceux pour leur expulsion (efflux) ([Colangelo and Guerinot, 2006](#)). L'influx des métaux est régulé par les transporteurs de type ZIP (connu pour l'intégration de Zn, Mn, Fe, Ni, Cd), NRAMP (Fe, Mn, Zn, Cd...), et YSL, qui absorbent des métaux de transition complexés avec des acides organiques sécrétés par la plante (phytosidérophores).

Les transporteurs correspondants aux efflux des métaux sont répartis principalement entre les HMAs (Heavy metal transporting ATPases), et les CDF (cation diffusion facilitator). Les transporteurs correspondant aux influx et aux efflux cités sont des protéines

Ces différents transporteurs correspondants aux influx et aux efflux sont des protéines membranaires.

Les aquaporines, également des protéines membranaires régulant le transfert de l'eau dans les cellules, peuvent constituer une voie de passage de certains éléments, comme l'acide borique, ou l'ammoniac ([Dordas and Brown, 2001](#); [Gerbeau et al., 2002](#); [Hachez et al., 2006](#)). Certains transporteurs sont dénommés High Affinity Transporters (HATS), et constituent une seconde stratégie de prélèvement de

certaines éléments (fer, cuivre, zinc...), définis par une aptitude supérieure à réguler l'influx d'un élément essentiel dans les cellules ([Epstein, E et al., 1963](#)).

La mécanique d'absorption des éléments dans la cellule peut elle-même être différente. Nous pouvons citer la stratégie d'acidification du milieu afin de dissoudre les métaux essentiels tels que le zinc et le cuivre ([Palmer and Guerinot, 2009](#)) ou le fer ([Morrissey and Guerinot, 2009](#)). Ce mécanisme est rendu possible par l'activité de pompe à proton ATPases, pouvant exsuder des ions H^+ à proximité de la racine. Dans le cas du fer, chez les dicotylédones, l'acidification et l'exsudation d'agents complexant (phénoliques) augmentent la solubilité des ions Fe^{3+} . Les ions ferriques sont réduits en Fe^{2+} par une réductase de la plante localisée dans la membrane plasmique et Fe^{2+} est transporté dans le rhizoderme par un transporteur (IRT1). C'est une stratégie de type I. Chez les monocotylédones, le prélèvement du fer est dépendant de la sécrétion de phytosidérophores (famille des acides muginéiques), présentant une haute affinité pour les ions Fe^{3+} . Le complexe sidérophore- Fe^{3+} est importé par un transporteur spécifique. Cette stratégie, basée sur la chélation, est appelée stratégie de type II.

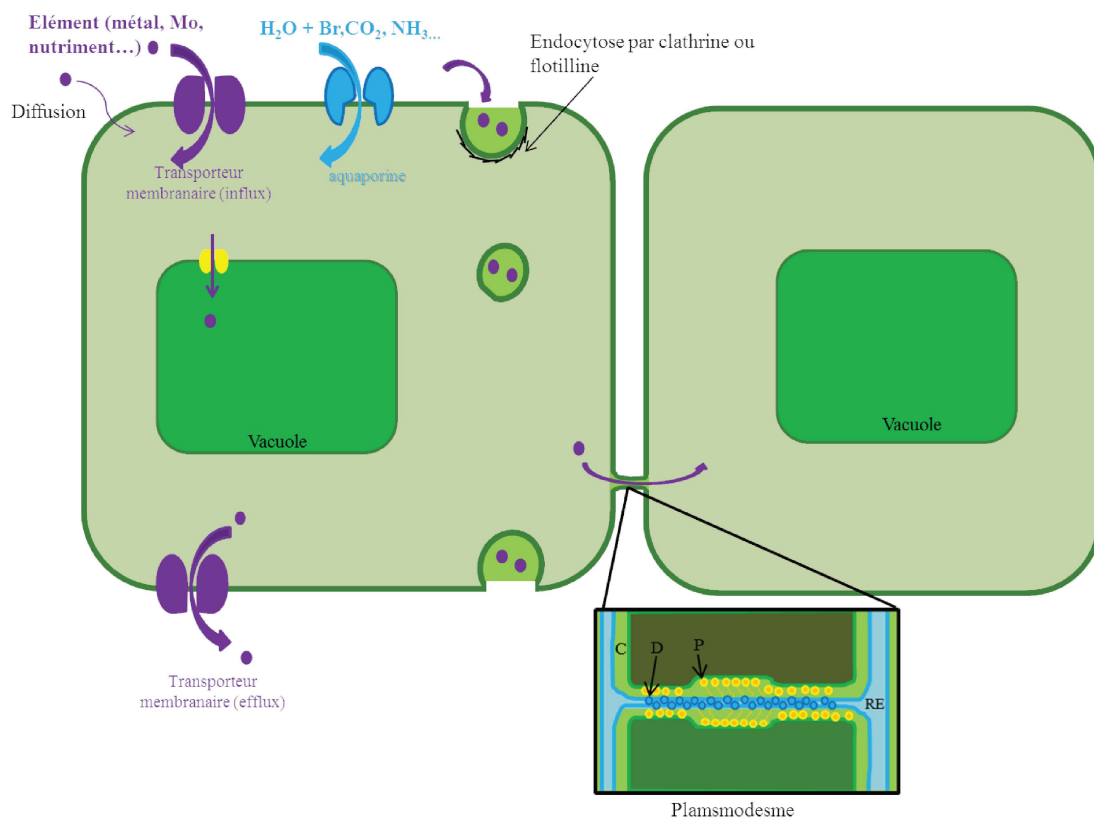


Figure 11 : Mode d'intégration dans les cellules de différents éléments issus du sol. Légende spécifique au plasmodesme : C : Cytoplasme ; D : microtubule ; P : protéine ; RE : réticulum endoplasmique. Illustration inspirée de ([Roberts and Oparka, 2003](#))

Selon leur sous classe, les plantes peuvent donc influencer différemment les conditions physicochimiques de la rhizosphère (composition de la matière organique, pH) pour prélever les nutriments.

Les plantes prélèvent également des protéines, lipides et molécules extracellulaires par endocytose. Ce mécanisme implique l'invagination de la membrane plasmique et la formation d'une vésicule intracellulaire contenant le matériel endocyté ([Fan et al., 2015](#)). Selon la taille des substrats, le processus est pris en charge par des récepteurs de type protéine de clathrine (~120nm), ou par des récepteurs associés à des micro-domaines riches en sphingolipides (lipide issu de la sphingosine), stérols et flotilline (protéine). Les vésicules fusionnent avec un endosome et sont triées pour assurer le recyclage des éléments importés, leur export vers la membrane ou leur destruction dans la vacuole.

I.4 Phytodisponibilité des Nanomatériaux

Les différentes phases de la disponibilité d'un élément pour les plantes ont été abordées. Nous allons maintenant décrire les modalités de la disponibilité des NMs. Nous commençons par la biodisponibilité environnementale des NMs, sachant que la disponibilité environnementale des NMs a déjà été abordée dans la [partie I.1d](#). Nous rappelons ici les paramètres de la rétention des NMs par les sols. Au niveau des nanomatériaux, la rétention va être régulée par leur charge de surface, dépendant du pH du sol, de la nature de l'élément constituant les NMs, et la présence de matière organique dissoute pouvant interagir avec la particule. Il a été observé également que la rétention des NMs est favorisée par une plus teneur croissante en argile.

I.4.a Biodisponibilité environnementale des NMs

La biodisponibilité environnementale des NMs nécessite d'étudier les phénomènes de transport et de rétention à travers les différents compartiments de la plante. Comme nous l'avons vu lors des phénomènes de rétention par la phase solide du sol.

- Interaction avec le mucilage

Plusieurs travaux ont démontré que le mucilage à la surface des racines pouvait retenir les NMs (tel que le CeO₂, le TiO₂, ou encore l'Ag). [Zhang et al. \(2011\)](#) ont démontré que les NMs de CeO₂ peuvent s'accumuler dans le mucilage à la surface racinaire du concombre. Le mucilage est principalement composé de polysaccharides hydratés ([Lin and Xing, 2008](#)). Le mucilage est donc chargé négativement (pKa≈3,5), ce qui peut impliquer, en fonction du pH, une rétention des NMs dans le mucilage. [Zhang et al. \(2011\)](#) précisent que le lavage de racines de concombre exposées à des NMs de CeO₂ en hydroponie, enlève 90% des particules. Ils supposent donc que la rétention de leur NMs de CeO₂ chargé positivement à pH=7 est liée au mucilage.

[Foltête et al. \(2011\)](#) ont observé des racines de fèves cultivées en solution nutritive, et exposées à des NMs de TiO₂. Au terme de l'exposition, des lots de racines subissent un lavage au sel neutre d'ammonium afin d'enlever le mucilage à la surface racinaire. Les observations de coupe de racine en

micro fluorescence permettent de voir qu'une partie des particules de TiO_2 sont intégrées dans la racine, et une partie n'est plus visible après le traitement d'extraction du mucilage. Les auteurs concluent donc sur une probable rétention des NMs dans le mucilage à la surface de la racine. [Kurepa et al. \(2010\)](#) ont également observé un phénomène de rétention dans le mucilage de graines d'*Arabidopsis Thaliana*.

Enfin, les NMs d'argent ont été observés en interaction avec le mucilage. Cette accumulation d'argent à la surface racinaire est même visible à l'œil nu, en raison d'une coloration brune, que l'on retrouve uniquement dans le cas d'une exposition aux NMs d'Ag ([Geisler-Lee et al., 2012](#)).

- Passage du suber

Le rhizoderme des parties les plus jeunes de la racine n'est pas subérifié. Lorsque le suber est présent il constitue une barrière hydrophobe qui limite le passage de l'eau et des ions ([Andersen et al., 2015](#)). Le suber constitue donc une barrière importante pour le passage des NMs. Cependant, il existe des zones plus perméables aux solutés à cause d'une couche de suber plus fine ou manquante, lié à un développement hétérogène de la couche de suber. Les NMs peuvent également traverser le suber en dégradant la couche grâce à la génération d'espèces réactives de l'oxygène ([Kolattukudy, 1981](#)). [Larue et al. \(2014\)](#) ont mis en évidence une dégradation de la cuticule, dont la structure est proche du suber ([Andersen et al., 2015](#)), autour des cellules de feuilles de laitue (*Lactuca sativa*), mises en contact avec des NMs de TiO_2 . La perméabilité des cellules aux NMs est augmentée avec l'ajout de tensio-actifs. Dans les feuilles, l'intégration de NMs quantum dots est favorisé par l'ajout de Silwet L-77, en augmentant la perméabilité de la cuticule ([Hu et al., 2010](#)). Des formulations sous forme nanométrique permettent également une meilleure pénétration de la matière active d'un produit phytopharmaceutique dans les plantes ([Hu et al., 2010](#)).

- Passage dans l'apoplasme

Nous avons expliqué dans la [partie I.3](#) que la taille des pores dans l'apoplasme peut varier en fonction de la proportion de certains composants (pectine ou hémicellulose). Après avoir traversé la barrière du mucilage ou du suber, les NMs peuvent s'accumuler dans l'apoplasme. Des NMs de fer sont observés dans la paroi des cellules de la racine d'*Arabidopsis thaliana* ([Kim et al., 2014](#)), ainsi que des NMs de TiO_2 dans l'apoplasme de racine de blé ([Larue et al., 2012a](#)). [Larue et al. \(2012a\)](#), ont démontré qu'il existe une taille limite au-dessus de laquelle les NMs de TiO_2 ne pénètrent pas dans la racine (140 nm), et une taille à partir de laquelle les NMs de TiO_2 peuvent s'accumuler dans le parenchyme mais ne traversent pas l'endoderme et n'atteignent donc pas le xylème (36 nm). L'intégration dans l'apoplasme a également été observé pour des NMs d'argent chez *Arabidopsis thaliana* ([Geisler-Lee et al., 2012](#)). [Zhao et al. \(2012\)](#) ont observé des agrégats de NMs de CeO_2 dans le parenchyme cortical. L'entrée dans la cellule de NMs de tailles supérieures à celles des pores du parenchyme est facilitée par la génération d'espèces réactives de l'oxygène. Les ROS peuvent dégrader la pectine ([Kim et al., 2014](#); [Larue et al., 2012a](#)). Les NMs ou les agrégats de plus grande taille peuvent donc être intégrés dans l'apoplasme. Au niveau des poils absorbants, la perméabilité pour les NMs est plus importante en

raison de la taille des pores pariétaux plus grands. Le prélèvement au niveau des poils absorbants a déjà été observé pour des NMs d'Au (6-10nm) ([Zhu et al., 2012](#)).

Comme nous l'avons indiqué dans la [partie I.3](#), l'apoplasme peut être chargé négativement au-delà d'un pH de 4-4,5. La dynamique des NMs dans la paroi cellulaire sera donc différente en fonction de la charge de surface des particules. [Zhu et al. \(2012\)](#) ont démontré que l'accumulation de NMs d'Au dans les racines de quatre plantes (riz, raygrass, radis et courge) était plus importante lorsque la charge de surface était positive comparée à une charge de surface négative. L'accumulation était plus importante, grâce une interaction électrostatique avec la paroi pectocellulosique, chargée négativement. En revanche, la concentration en Au était plus importante dans les parties aériennes lorsque les NMs étaient chargées négativement, car la rétention dans l'apoplasme est réduite.

- Passage du cadre de Caspary

Comme pour l'épiderme, le passage entre le parenchyme cortical et l'endoderme nécessite le passage d'une couche de suber. La couche va donc limiter fortement le passage des éléments. Le passage des éléments dans l'endoderme va donc nécessiter l'absorption par les cellules et le transfert par voie symplasmique. Plusieurs travaux montrent que les NMs ne traversent le cadre de caspary qu'au niveau des lacunes et qu'il est peu probable que les NMs puissent passer à travers le suber ([De la Torre-Roche et al., 2014](#); [Hu et al., 2010](#); [Majumdar et al., 2016](#)).

- Absorption des NMs dans les cellules

Comme nous l'avons vu dans la [Figure 11](#) les cellules possèdent différents mécanismes pour internaliser des substrats. Dans le cas des transporteurs membranaires, le canal formé par ces protéines membranaires est inférieur à 1 nm de diamètre ([Ramesh et al., 2013](#)). Il est donc peu probable que les NMs puissent être intégrées dans les cellules selon cette voie de transport ([Wang et al., 2011a](#)). L'internalisation des NMs la plus probable dans les cellules est l'endocytose ([Etxeberria et al., 2006](#)). L'utilisation d'inhibiteurs des mécanismes d'endocytose induit une baisse de prélèvement de NMs (Au) comprise entre 20 et 40% ([Li et al., 2016](#)), chez la tomate et le riz. Les deux types d'endocytose ont été observés pour l'intégration des NMs dans les cellules. L'endocytose formée par la clathrine peut internaliser les NMs dans les cellules végétales. Ce phénomène a été observé avec des particules d'or de 20 nm ([Moscatelli et al., 2007](#); [Onelli et al., 2008](#)), des quantum dots Cd/ZnS de 20 nm et des NMs de polystyrène de 40 nm ([Etxeberria et al., 2006](#)), ou des nano billes ayant un diamètre de 20 et 40 nm ([Bandmann et al., 2012](#)). Les vésicules formées par endocytose ont généralement un diamètre compris entre 50 et 90 nm ([Barth and Holstein, 2004](#); [Marsh and McMahon, 1999](#); [Mayor and Pagano, 2007](#)), même si des tailles plus élevées (au-delà de 100 nm) sont possibles ([Barth and Holstein, 2004](#)). La limitation de taille liée au diamètre de vésicules constitue un autre facteur d'exclusion des NMs au sein de la plante. L'endocytose indépendante de la clathrine et induite par d'autres protéines est également responsable de l'absorption de NMs ([Bandmann et al., 2012](#); [Etxeberria et al., 2006](#); [Iversen et al., 2011](#); [Moscatelli et al., 2007](#); [Onelli et al., 2008](#)). De plus, [Li et al. \(2016\)](#) ont mis en évidence que la charge de surface des NMs n'avait pas d'impact sur le prélèvement par endocytose.

Enfin, [Etxeberria et al. \(2006\)](#) ont mis en évidence que le devenir des NMs une fois absorbé par la cellule par endocytose, pouvait changer en fonction de leurs natures. Si les NMs de polystyrène sont repérés dans la vacuole, les quantum dots sont en partie dans la vacuole et persistant dans le cytoplasme après 18 heures d'exposition. Les auteurs émettent l'hypothèse d'un mécanisme de reconnaissance et de distribution des NMS dans la cellule. Cette différence d'organe cible peut aussi être liée à différents mode de prélèvement à la surface cellulaire ([Iversen et al., 2011](#)), c'est-à-dire différents types d'endocytoses (utilisation ou non de molécules de clathrines pour former l'endosome). La diversité des NMs peut elle-même affecter son parcours dans la cellule. Les NMs pouvant former des ROS sont en effet capables de dégrader les endosomes une fois dans le cytoplasme ([Berg et al., 2010](#)).

- Transport symplasmique

Une fois intégrés dans les cellules, les NMs devront traverser le plasmodesme pour atteindre les vaisseaux du xylème. [Geisler-Lee et al. \(2012\)](#) ont observé les NMs d'Ag (20, 40 et 80nm) au niveau du plasmodesme de racines d'*Arabidopsis thaliana* cultivées en hydroponie. Les auteurs signalent cependant qu'il est difficile de distinguer les NMs effectivement intégrés dans le plasmodesme de ceux présents dans l'apoplasme, adsorbés autour du plasmodesme. L'argent présent dans les cellules semble être des NMs d'Ag initialement introduits. Une expérience préalable avec de l'argent Ag^+ démontre que l'argent réduit est présent dans les cellules mais négligeable. La présence autour du plasmodesme est également mise en évidence avec des NMs d'Au (10 et 30 nm) dans le haricot vert ([Brown et al., 1998](#)). [Zhai et al. \(2014\)](#) observent également les NMs d'Au (15, 25 et 50 nm) au niveau du plasmodesme du peuplier. L'Au observé dans les plantes n'a pas été dissous pendant le prélèvement des NMs. Les auteurs observent les NMs également au niveau du xylème. Ceci implique un passage par le plasmodesme, qui peut constituer une discrimination par la taille (SEL, pour Size Exclusion Limit) des éléments arrivant dans le xylème. En effet, le plasmodesme a un diamètre compris entre 3 et 4 nm ([Fisher, 1999](#); [Lucas and Wolf, 1993](#)). Cependant, tout comme la paroi pectocellulosique, il est possible que le diamètre soit modifié. Le diamètre peut être réduit par le dépôt de callose, un glucane, à la périphérie du plasmodesme ([Roberts and Oparka, 2003](#)). Le diamètre peut au contraire être augmenté, suite à la dégradation des microtubules formant le cytosquelette du plasmodesme. [Wang et al. \(2011b\)](#) ont mis en évidence que les NMs de TiO_2 pouvaient altérer ces microtubules ([Wang et al., 2011b](#)). [Larue et al. \(2012a\)](#) en déduisent la possibilité pour les NMs de TiO_2 ayant une taille de 20 nm d'atteindre le xylème via le plasmodesme.

- Transfert des nanomatériaux dans le système vasculaire

Le passage des NMs dans les parties aériennes nécessite le passage dans les tissus conducteurs tels que le xylème et le phloème. Le phloème est la voie de transfert des différents composés organiques depuis leurs zones de synthèse (parties aériennes), vers les zones d'utilisation (croissance ou respiration) ou de stockage ([Minchin and Lacointe, 2005](#)). La présence des NMs dans le xylème et le transfert de différents NMs a déjà été documentée pour plusieurs NMs. Nous pouvons citer quelques exemples,

concernant le CeO₂ ([Zhao et al., 2012](#)), le TiO₂ ([Larue et al., 2012a](#)), et les NMs d'Ag ([Geisler-Lee et al., 2014](#)). Un fois intégré dans le xylème. Les NMs vont suivre le flux des éléments à travers les vaisseaux grâce à la poussée racinaire et à l'évapotranspiration. Là encore, la taille des pores du xylème va jouer un rôle important dans la sélection des NMs. Le diamètre des pores du xylème est généralement d'environ 5 nm ([Choat et al., 2003](#); [Shane et al., 2000](#)), même si ce diamètre peut dépasser 100 nm en fonction des espèces ([Jarbeau et al., 1995](#); [Shane et al., 2000](#)). Le passage dans le phloème est moins documenté. Cependant, la présence des NMs dans des fruits implique un passage des NMs dans le phloème, ce qui a déjà été observé ([Larue et al., 2014](#); [Servin et al., 2012](#)). Précisons que les NMs ont pu être directement observés dans le phloème, comme dans le cas des NMs d'Au ([Zhai et al., 2014](#)), ou de CeO₂ ([Hong et al., 2014](#)). Il a été démontré que les NMs peuvent être modifiés durant leur entrée dans l'organisme. [Schwabe et al. \(2015\)](#) ont évalué la phytodisponibilité de NMs de Zr/CeO_x (zirconium et oxyde de cérium) dans des plants de tournesol, de blé et de citrouille, avec un rapport molaire CeO_x:Zr de 1:2. L'objectif est de déterminer, en fonction de la concentration des deux éléments dans la plante, d'une éventuelle dissolution du Cérium. Le rapport devient supérieur à 1:2 dans les parties aériennes. Ceci implique qu'une partie du cérium absorbé dans la plante l'a été en étant dissocié du zirconium. Une partie du cérium est donc transformée. [Zhang et al. \(2012\)](#) ont étudié la spéciation de NMs de CeO₂ absorbés par le concombre. Les auteurs proposent que le CeO₂, à la surface de la racine, soit dissous, puis précipite dans la racine sous forme de phosphate de Cérium (CePO₄), et peut se lier avec des acides organiques.

- Phytodisponibilité des NMs en fonction de la sous classe de la plante

Comme nous l'avons indiqué à la [partie I.3.a](#) I.3.a Transport racinaire des éléments, la phytodisponibilité des métaux peut différer entre monocotylédones et dicotylédones. Plusieurs travaux ont cherché à comparer la disponibilité de NMs pour des monocotylédones et dicotylédones. [Lopez-Moreno et al. \(2010a\)](#) mettent en évidence une concentration en cérium plus importante dans les dicotylédones (luzerne, tomate, concombre) que dans une monocotylédone (maïs) exposés à des NMs de CeO₂ (de 500 à 4000 mg.L⁻¹). [Judy et al. \(2012\)](#) montrent également que le tabac (dicotylédone) exposé en hydroponie à des NMs d'Au NPs (30 mg.L⁻¹) accumule une plus grande concentration en or que le blé (monocotylédone). [Schwabe et al. \(2013\)](#) ont comparé la concentration en cérium dans blé et la courge (dicotylédone) exposés en hydroponie à des NMs de CeO₂ (100 mg.L⁻¹). La concentration en cérium était plus importante dans les racines de blé, et plus importante dans les tiges de la courge. Les auteurs attribuent la concentration plus importante dans les racines de blé à une biomasse plus faible comparé à la courge. La concentration en Ce plus importante dans les tiges de courge est expliqué par une évapotranspiration plus importante que celle du blé.

[\(Zhu et al., 2012\)](#) ont comparé la phytodisponibilité des NMs d'Au (31 nmol.L⁻¹) dans deux dicotylédones (radis et courge) et deux monocotylédones (ray grass et riz) en hydroponie. Dans ce cas,

le radis et le ray grass présentent les plus forte concentrations en Au, comparé au riz et à la courge. La comparaison entre les monocotylédones et les dicotylédones met en évidence une concentration plus faible chez les monocotylédones. En revanche, le facteur de translocation (concentration dans les tiges/concentration dans les racines) est plus important pour les monocotylédones que pour les dicotylédones. Enfin [Zhu et al. \(2008\)](#) ont évalué la phytodisponibilité de NMs de Fe₃O₄ dans la courge et le haricot. Chez la courge, la concentration en fer des plantes exposées aux NMs est différente de celle des plantes non exposées, ce qui n'est pas le cas chez le haricot, alors que les deux plantes sont des dicotylédones. La différence de phytodisponibilité entre les monocotylédones et les dicotylédones peut s'expliquer par la différence de morphologie des appareils racinaires. Selon leur appartenance à la sous-classe des mono- ou dicotylédones, les racines des plantes présentent une architecture différente. Les monocotylédones, présentent un appareil racinaire souvent fasciculé, formé de racines de tailles similaires et généralement non ramifiées tandis que les dicotylédones possèdent une architecture comportant une racine principale pivotante et des racines secondaires. Les dicotylédones peuvent avoir une surface de contact entre les racines et le sol plus importante que les monocotylédones. Cette différence peut augmenter avec une plus grande densité de poils absorbants ([Zhu et al., 2012](#)).

I.4.b Biodisponibilité toxicologique des nanomatériaux

La toxicité des différents NMs dans le monde animal a déjà été étudiée et peut être la conséquence du transfert des NMs depuis le monde végétal vers les consommateurs. Les travaux présentés dans cette thèse n'ont pas abordé la phytotoxicité des NMs étudiés, mais les modalités de prélèvement en fonction de plusieurs paramètres. Il convient tout de même de présenter certains aspects de la toxicité qui se manifeste à plusieurs niveaux de la plante.

- Développement

Les NMs peuvent dans un premier temps affecter différemment la germination des graines, en fonction de l'espèce et de la nature des NMs. Si [Lopez-Moreno et al. \(2010b\)](#) observent une réduction du taux de germination de graine tomate et de concombre exposées à des NMs de CeO₂, [Suriyaprabha et al. \(2012\)](#) observent au contraire une augmentation du taux de germination de graine de maïs, exposées à des NMs de SiO₂. D'autres articles enfin n'observent pas d'impact sur la germination ([Stampoulis et al., 2009](#)), ou un impact inférieur à la forme ionique des métaux présents dans les NMs ([Pokhrel and Dubey, 2013](#)). Les NMs peuvent également induire un retard de croissance sur les plantes ([Stampoulis et al., 2009](#)). [Burklew et al. \(2012\)](#) ont observé une diminution de la longueur racinaire de plants de tabac exposés à des NMs d'Ag, ou de soja exposés à des NMs de ZnO. Plus globalement les NMs peuvent entraîner une diminution de biomasse des plantes ([De La Torre-Roche et al., 2013](#); [Stampoulis et al., 2009](#)). Enfin, elles peuvent avoir un impact sur la génération suivant la génération mise en contact avec les NMs. [Geisler-Lee et al. \(2014\)](#) démontrent qu'en exposant la génération E0

d'*Arabidopsis thaliana* à des NMs d'argent, les générations E1 à E3 présentent des taux de germinations plus faibles que la première génération. [Wang et al. \(2013b\)](#) ont mis en évidence également que l'exposition de la première génération à des NMs de CeO_2 entraîne une plus faible biomasse que des générations suivantes. Les NMs peuvent aussi avoir l'effet inverse sur la biomasse. [Wang et al. \(2013a\)](#) ont mis en évidence une augmentation de la longueur racinaire lorsqu'*Arabidopsis thaliana* était exposé à des concentrations de NMs d'Ag intermédiaire ($0,01$ et $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$, contrairement à $0,1$, $0,2$ et 1 mg.L^{-1}).

Il convient de préciser que la concentration à laquelle est exposée une plante peut également induire une toxicité qui va modifier la physiologie de la plante. [Feichtmeier et al. \(2015\)](#) ont étudié l'impact sur *Hordeum vulgare* (orge), de NMs d'Au à des concentrations croissantes en solution (1 , 3 , 5 , 8 , et 10 mg.L^{-1}). La longueur des racines et des tiges baissent progressivement avec la concentration en Au dans la solution de culture. De plus, les auteurs ont observé des dégradations des racines, avec par exemple, une diminution de la taille des pores racinaires, ce qui limite la capacité d'absorption d'eau des plantes. Nous voyons donc qu'utiliser des concentrations élevées de NMs dans le milieu de culture peut modifier la phytodisponibilité, liée à des phénomènes de toxicité.

- Cytotoxicité

De nombreuses études ont montré que les NMs perturbent le fonctionnement des cellules végétales ([Hossain et al., 2015](#); [Remédios et al., 2012](#)). La Figure 12 résume les potentiels effets toxiques de NMs.

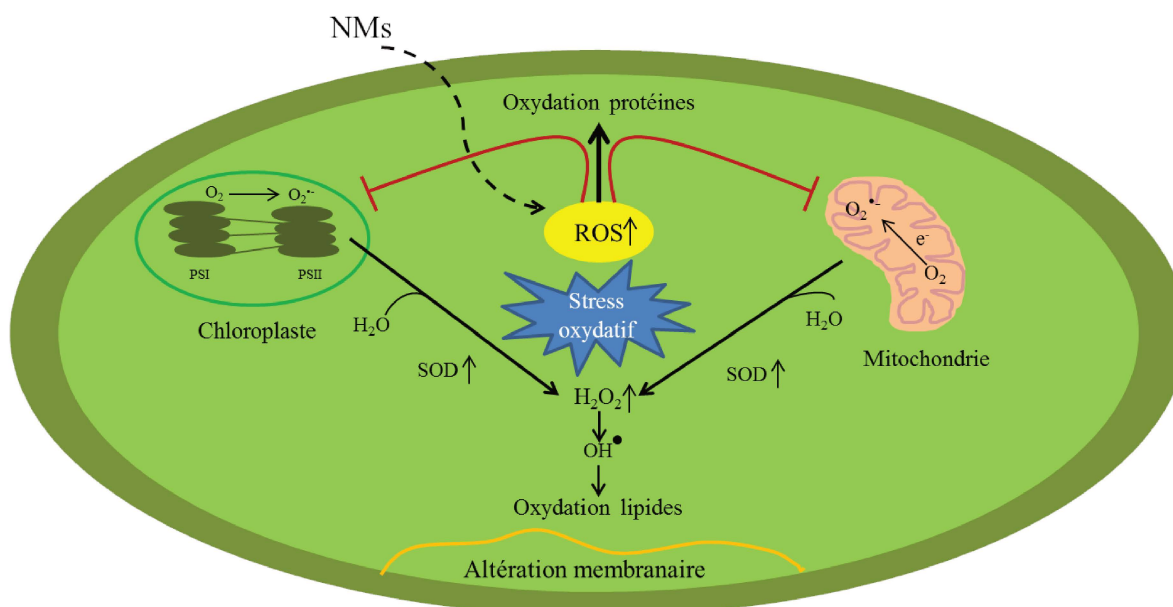


Figure 12 : Toxicité induite par les NMs dans les cellules. Génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), oxydation de protéines ou de lipides membranaires. Les flèches orientées vers le haut indiquent une augmentation de la concentration en ROS, SOD (superoxyde dismutase), ou H_2O_2 . Illustration inspirée de ([Hossain et al., 2015](#)).

Parmi les dysfonctionnements générés, nous pouvons citer des phénomènes de réduction du volume de la vacuole dans le maïs et dans le chou ([Pokhrel and Dubey, 2013](#)), une baisse du taux de chlorophylle dans le pois exposé à des NMs de ZnO ([Mukherjee et al., 2014](#)). La membrane cellulaire peut également être altérée par peroxydation des lipides, lié à la génération de ROS. Des NMs d' Al_2O_3 peuvent générer des ROS et altérer la membrane plasmique dans les cellules des cellules de tabac ([Poborilova et al., 2013](#)).

- Génotoxicité

En réduisant encore l'échelle d'observation, nous pouvons voir que les NMs peuvent provoquer plusieurs modifications sur l'ADN (acide désoxyribonucléique) ou l'expression de certains gènes de la plante. Les NMs peuvent par exemple fragmenter l'ADN. La réaction d'oxydation des lipides entraîne la formation de malondialdéhyde, agent pouvant modifier la conformation de l'ADN ([Poborilova et al., 2013](#)). [Lopez-Moreno et al. \(2010a\)](#) ont également constaté une dégradation dans l'ADN de cellules de soja, exposé à des NMs de CeO_2 .

I.5 Intégrer la complexité du milieu de culture

Il a été mis en évidence que les NMs subissent des transformations dans les sols, pouvant modifier les interactions avec les compartiments de la racine (charge de surface, dissolution...). Au-delà des modifications chimiques et de surface, le sol constitue un milieu d'interactions complexes entre les constituants et les différents organismes qui l'habitent. La plante peut, via le sol, établir des échanges avec les insectes, les bactéries ou les champignons mycorhiziens ([Judy and Bertsch, 2014](#); [Schwab et al., 2015](#)). Cette zone d'échange, sous l'influence de l'activité de la plante, est la rhizosphère ([Hinsinger et al., 2003](#)). Or une partie des travaux étudiant la phytodisponibilité des NMs dans les sols utilise une solution nutritive (hydroponie) pour la culture des plantes. Le phénomène d'interaction des NMs avec le sol est absent en hydroponie, ce qui entraîne probablement une surestimation de la quantité de NMs disponible pour la plante. La culture en hydroponie ne permet pas la colonisation des racines par des bactéries et des champignons mycorhiziens, et donc ne prend pas en compte leurs interactions avec les NMs. ([Sun et al., 2015](#)). Les facteurs biotiques ne peuvent pas être pris en compte dans le devenir des NMs, lorsque l'on utilise un milieu artificiel ([Dwivedi et al., 2015](#)).

Les mycorhizes vont dépendre des germes présents dans les sols et vont parasiter les racines. On distingue deux modes de symbiose avec les racines : l'endomycorhize, qui s'intègre dans la racine et interagit directement avec la membrane plasmique, et l'ectomycorhize qui se développe à la surface de la racine et interagit au niveau de la paroi ([Duponnois et al., 2003](#)). Les mycorhizes induisent une modification de la morphologie racinaire dans les sols ([Atkinson et al., 2003](#)), et permettent un

prolongement racinaire, permettant d'explorer des zones supplémentaires du sol. Elles peuvent également avoir un impact sur le prélèvement d'éléments nutritifs et de métaux par les plantes ([Dugassa et al., 1995](#)). Les effets des NMs sur les mycorhizes sont encore peu étudiés ([Feng et al., 2013](#); [Judy and Bertsch, 2014](#); [Schwab et al., 2015](#)). [Feng et al. \(2013\)](#) ont étudié les effets des NMs de FeO et d'Ag sur le champignon *Glomus caledonium*, en symbiose avec le trèfle blanc. A forte concentration (3.2 mg.kg^{-1} de sol) les NMs de FeO réduisent la masse comprenant les mycorhizes et les racines. Ce phénomène est également observé pour les NMs d'Ag (0.01 mg.kg^{-1})

Comme nous l'avons vu dans la [Figure 4](#), l'interaction des NMs avec les bactéries spécifiques du sol est essentielle pour comprendre le devenir des NMs. L'étude en hydroponie va donc faire perdre une grande partie des informations pour évaluer la disponibilité des NMs.

La diversité microbienne peut être régulée dans la rhizosphère par l'action de la plante, via la sécrétion d'exsudats ([Haichar et al., 2008](#); [Marschner et al., 2001](#)), or le mode de culture peut modifier la nature et la cinétique d'exsudation des plantes. [Oburger et al. \(2013\)](#) ont par exemple mis en évidence une différence de la nature des acides aminés sécrétés par le maïs cultivés dans différentes conditions : hydroponie, en sol, et en rhizobox. [Oburger et al. \(2014\)](#) ont également observé, avec la culture du blé une concentration en phytosidérophore cinquante fois plus basse lorsque la plante est cultivée en sol, comparé à une culture en hydroponie. Les auteurs précisent aussi que le taux de sécrétion d'exsudats varie en fonction des différents sols utilisés.

Au niveau de la plante, la différence de mode de culture peut avoir un impact sur la disponibilité des métaux. [Zabludowska et al. \(2009\)](#) montrent que la disponibilité de l'arsenic pour plusieurs plantes issues de zones minières est différente entre une culture en hydroponie et en sol. La concentration est plus basse lorsque les plantes sont cultivées en hydroponie. Inversement, le facteur de translocation (TF), c'est-à-dire le rapport entre la concentration en As dans les tiges et dans les racines, augmente lorsque les plantes sont cultivées en hydroponie.

Suivre la dynamique d'un contaminant dans un milieu aussi complexe que le sol est difficile ([Luo et al., 2013](#)). L'utilisation de substrats artificiels (grains de quartz, billes de verre, billes de PVC...) comme substitution d'un sol ne reproduit pas fidèlement ce milieu complexe ([Darlington et al., 2009](#); [Quevedo and Tufenkji, 2012](#); [Sagee et al., 2012](#); [Sun et al., 2015](#)). La différence de rétention des NMs entre les milieux est en partie liée à la surface d'interaction plus importante dans les sols naturels (présence d'argile), et à des charges de surfaces équivalentes entre les particules et le substrat artificiel, limitant la rétention.

Il convient également de considérer le cycle de vie d'un NMs, c'est-à-dire sa production, sa formulation, l'utilisation du produit dans lequel le NMs est intégré, puis sa mise en décharge, son recyclage ou un autre traitement des déchets.

Les paramètres du cycle de vie peuvent modifier les propriétés physicochimiques et par conséquent le devenir des NMs dans l'environnement. L'épandage de boues de stations d'épuration sur les parcelles

agricoles constitue l'une des principales voies d'entrée des NMs dans les sols ([Gottschalk et al., 2015](#)). [Barton et al. \(2014\)](#) ont ajouté dans un réacteur de boue de stations d'épuration des NMs de CeO_2 (état d'oxydation Ce^{IV}) enrobés ou non de citrate. Au bout de cinq semaines d'incubation, les auteurs ont étudié la répartition du cérium et sa spéciation. 90% du CeO_2 était associé à la phase solide des boues. De plus, le cérium est réduit à l'état Ce^{III} . Sans enrobage, 44% du cérium est réduit à l'état de Ce^{III} , 31% lorsqu'il y a un enrobage de citrate. Les auteurs estiment que le cérium réduit est présent sous forme de Ce_2S_3 . Des modifications des NMs de Ag sont également observées, et les proportions des nouvelles formes de Ag varient en fonction des conditions de synthèse des boues ([Ma et al., 2014](#)). Les auteurs ont comparé la spéciation des NMs incubés dans des boues séchées (conditions oxydantes), ou humidifiées à 37°C (conditions réductrices). Dans le cas de Ag, une part supérieure à 90% est sous forme de Ag_2S , quelles que soient les conditions d'incubation des boues. Le cycle de vie pouvant modifier des propriétés des NMs, il déterminera donc la phytodisponibilité des éléments. Déterminer la phytodisponibilité de NMs nécessite d'expérimenter la croissance des plantes dans des sols pour se rapprocher de conditions plus complexes et réalistes. Néanmoins, l'expérimentation en sol présente l'inconvénient de mêler des particules de sol aux racines, qu'il est délicat de séparer. La mesure de la concentration de métaux dans les racines pourra être donc perturbée par les particules de sol. Afin de compenser la capacité de rétention des sols, et permettre la détection des NMs associés aux racines et exportés dans les feuilles, des concentrations importantes dépassant les concentrations des NMs correspondantes estimées dans l'environnement sont actuellement utilisées ([Holden et al., 2014](#); [Servin and White, 2016](#)).

Caractériser la phytodisponibilité des NMs nécessite d'utiliser un dispositif de culture proche des conditions de culture dans un sol, permettant une récolte des racines exemptes de particules de sol, tout en utilisant des concentrations de NMs dans une gamme proche des concentrations prédites dans l'environnement. Cette question s'est déjà posée dans le cadre de la phytodisponibilité des éléments traces métalliques. La réponse aux contraintes techniques décrites a conduit à la conception du RHIZOtest. Il s'agit d'un dispositif permettant la culture d'une plante sur un sol, séparée par une toile en polyamide dont la taille des pores est de $30\text{ }\mu\text{m}$. La séparation permet une récolte plus facile des plantes car elle ne nécessite pas une extraction des particules de sol des racines. L'outil a été développé par [Chaignon and Hinsinger \(2003\)](#), et est désormais un biotest normalisé dans le cadre de la phytodisponibilité ([ISO-16198, 2015](#)). Nous pouvons prendre comme exemple [Bravin et al. \(2010\)](#). Ils ont comparé la phytodisponibilité du cuivre chez le blé cultivé en sol (l'étude comprenait 44 sols différents) à plusieurs méthodes chimiques d'évaluation de la phytodisponibilité et à la culture en RHIZOtest. Cette dernière méthode présente les résultats les plus proches des observations au champ en termes de modification du pH au sein de la rhizosphère et de prélèvement du cuivre. La concentration en cuivre dans les plantes pouvait être corrélée à la concentration totale en cuivre dans les sols. Les auteurs estiment que les résultats issus du RHIZOtest étaient plus proches que d'autres

méthodes d'extraction du cuivre. De plus, le RHIZOtest permettait de rendre compte d'une alcalinisation du sol en présence du blé, ce que les auteurs ont observé sur les prélèvements de blé au champ.

Comme nous l'avons expliqué dans la [partie I.4](#), la différence de phytodisponibilité entre les plantes peut être liée à une différence de surface de contact entre le sol et l'appareil racinaire. Si nous souhaitons déterminer l'impact de la rhizosphère (diversité bactérienne, diversité d'exsudats, différence de stratégie de prélèvement des éléments), il est souhaitable de comparer la phytodisponibilité à surface de contact égale, quelle que soit la plante étudiée. Le RHIZOtest peut apporter une solution car chaque plante peut développer son appareil racinaire dans un espace contraint et ayant une aire de contact avec le sol identique quel que soit le dispositif. Une description plus détaillée du RHIZOtest est présentée dans l'[Annexe I](#). Cette uniformité est rendue possible par une croissance préalable des plantes en hydroponie, formant un mat racinaire de superficie similaire avant d'être mis en contact avec le sol (voir [Figure 13](#)).

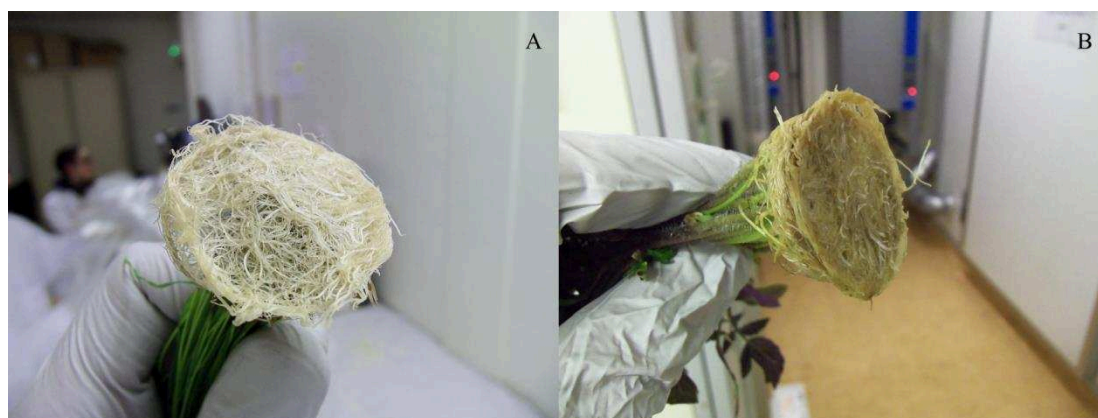


Figure 13 : Image des appareils racinaires de fétuque (A) et de tomate (B), lors de la récolte après la phase de croissance en hydroponie.

I.6 Questions et objectifs de la thèse

L'utilisation croissante de NMs dans des applications technologiques et dans des produits de consommation courante conduit à leur libération potentielle dans l'environnement. Les NMs font partie des polluants émergents ([Marcoux et al., 2012](#)) et les sols constituent un compartiment environnemental cible pour les NMs. Ce chapitre bibliographique nous a permis de souligner le rôle des caractéristiques physicochimiques du sol vis-à-vis de la dynamique (rétention, transport) des NMs. La diffusion des éléments traces métalliques dans les sols est une problématique qui est désormais prise en compte dans la gestion de la ressource sol, notamment dans le contexte du transfert de métaux toxiques dans les denrées alimentaires ([Tremel-Schaub and Feix, 2005](#)). La gestion des sols implique donc d'étudier les paramètres environnementaux qui peuvent réguler la phytodisponibilité des NMs.

Nous avons défini le concept de phytodisponibilité appliqué aux NMs, ce qui nous a conduits à décrire comment les plantes prélèvent des NMs dans les sols, et à considérer les différentes voies d'interactions et d'entrées des NMs dans la plante.

Afin d'évaluer les risques de contamination de la chaîne alimentaire, il est essentiel d'enrichir les connaissances sur la phytodisponibilité des NMs dans un scénario d'exposition le plus réaliste possible. La cohérence du scénario d'exposition des plantes aux NMs repose sur i) une culture en interaction avec un sol naturel permettant de prendre en compte la rétention des éléments par les éléments du sol, et les interactions avec les microorganismes et la plante, ii) des concentrations en NMs dans les sols proches des estimations actuelles, iii) la prise en compte du cycle de vie des NMs, impliquant l'utilisation de formes altérées des NMs initialement produits.

Durant ces travaux de thèse nous avons étudié la phytodisponibilité des NMs grâce au RHIZOtest à des concentrations proches de celles estimées dans les sols, afin de satisfaire les deux contraintes citées précédemment. Dans ce cadre, l'ADEME a apporté son soutien financier à nos travaux pour déterminer la phytodisponibilité des NMs dans des plantes utilisées dans l'alimentation humaine ou animale.

La sous classe de la plante peut avoir une influence sur l'absorption des NMs. Nous avons donc sélectionné deux types de plantes, la tomate (dicotylédone) et la fêtuque (monocotylédone) **pour déterminer l'influence de la morphologie et du métabolisme des monocotylédones et des dicotylédones sur la phytodisponibilité des NMs.**

La nature chimique des NMs, leurs tailles, leur formes, leur propriétés de surface, pourront avoir une influence sur leurs comportements et leurs devenir dans les sols ([Scheringer, 2008](#)). Il est donc envisageable de concevoir des NMs afin de limiter leur phytodisponibilité. Ce concept porte le nom de « Safer by design », traduit en français par Eco-conception ([Wang et al., 2016](#)).

Il est possible de calibrer en même temps la chimie (nature et phase cristalline), la taille, les propriétés de surface du matériau afin de limiter les risques liés, tout en conservant les propriétés souhaitées ([Morose, 2010](#)). Un moyen souvent évoqué dans la littérature est la fonctionnalisation, ou l'enrobage, des NMs avec des molécules (liaisons covalentes ou non) ([Kookana et al., 2014](#); [Lacerda et al., 2008](#)). Le labex SERENADE (Safer Ecodesign Research and Education applied to Nanomaterial Development, www.labex-serenade.fr) a cofinancé ces travaux de thèse. **Il a ainsi été possible d'étudier l'influence de trois composantes des NMs sur leur phytodisponibilité :**

- **La nature chimique** : choix de NMs utilisés et présentant une chimie contrastée, capable d'être réduites (CeO_2), oxydées ($\text{Ag}(0)$) ou qui ne se dissolvent pas (TiO_2).
- **Les caractéristiques physicochimiques** : la taille des particules (entre 3 et 250 nm), la forme (sphère, cubes, cylindre), l'enrobage (anionique, neutre).

De plus, la question posée par les NMs à base d'oxyde métallique ou de métaux est de savoir si la problématique se résout à celle des ions libres, nous avons donc utilisé des contrôles impliquant l'élément métallique en comparaison des NMs. Les différentes revues bibliographiques nous mènent

donc à nous demander, dans un scénario proche de la réalité, **quels sont les différents facteurs environnementaux et intrinsèques aux propriétés des NMs pouvant réguler la phytodisponibilité des NMs. De plus, est-il possible de hiérarchiser les facteurs influençant sur cette phytodisponibilité?**

Dans la suite de la thèse, nous allons répondre aux questions posées à travers, successivement, trois études sous forme d'articles publiées ou à soumettre dans des revues internationales. Nous avons hiérarchisé les paramètres environnementaux (type de sol, plante cultivée) et liés aux NMs (paramètres cités précédemment). Nous décrirons les résultats issus de l'étude de la phytodisponibilité de NMs de CeO_2 pour la tomate et la fêtuque, de la phytodisponibilité de NMs de TiO_2 , et de la phytodisponibilité de NMs de Ag.

Chapitre II : Utilisation du RHIZOtest pour l'étude de la phytodisponibilité des nanomatériaux. Premier cas d'étude : le dioxyde de cérium.

II.1 Résumé de l'étude

Les NMs d'oxyde de cérium (CeO_2) ont des propriétés optiques et catalytiques spécifiques, et présentent un intérêt industriel pour la conservation de surfaces contre les rayons ultraviolets (intégration dans des peintures), ou pour l'optimisation de la combustion de carburants (intégration dans le diesel). L'utilisation de ces produits entraîne le rejet de NMs de CeO_2 dans le sol, en contact avec des plantes. Les modélisations ont permis d'estimer une concentration de CeO_2 dans les sols comprise entre 1 et 1.10^{-5} mg.kg^{-1} ([Gottschalk et al., 2015](#); [Keller et al., 2013](#); [Park et al., 2008](#)).

Nous avons vu dans le précédent chapitre, que la phytodisponibilité des NMs pouvait être conditionnée par la nature des sols. Plusieurs travaux avaient mis en évidence l'impact, entre autres, du taux d'argile, de la matière organique dissoute et du pH sur la rétention des NMs dans les sols. La recherche bibliographique a également mis en évidence que la formulation (taille, enrobage) des NMs pouvait avoir un impact sur la rétention des NMs dans les sols, ou sur leurs phytodisponibilités. Dans le cas des plantes, la disponibilité peut être limitée en raison d'un seuil d'exclusion par la taille au niveau de l'appareil racinaire (taille des pores de l'apoplasme, taille des vésicules d'endocytose...).

Dans le même temps, nous avons rappelé que les dicotylédones ont une capacité d'échange cationique racinaire plus importante que les monocotylédones.

Plusieurs études ont étudié la phytodisponibilité des NMs de CeO_2 . Mais les plantes étaient le plus fréquemment cultivées en hydroponie, ce qui empêche la prise en compte des différents paramètres physico-chimiques du sol et de la rhizosphère dans la phytodisponibilité des NMs. De plus, les concentrations en NMs auxquelles étaient exposées les plantes étaient supérieures aux concentrations estimées dans les sols.

Pour la première étude de la phytodisponibilité des NMs, nous avons utilisé le dispositif RHIZOtest afin d'étudier les différents paramètres cités précédemment dans une même expérimentation. Les plantes cultivées étaient préalablement mises en germination et en phase de croissance en hydroponie. Au bout de deux semaines de cultures les plantes étaient mises en contact avec les sols. Les sols étaient contaminés par une suspension de NMs, 45 minutes avant la mise en contact avec les plantes. Après 8 jours de contact, les plantes étaient récoltées. Les racines et les tiges étaient séparées puis séchées dans une étuve à 50°C . Après pesée de chaque échantillon, les racines et tiges étaient minéralisées afin de déterminer la quantité en métal contenue dans les plantes. L'expérimentation comprenait deux sols ayant des propriétés physicochimiques différentes en termes de texture, de matière organique, et de pH. Deux plantes appartenant à la sous classe des monocotylédones (fétuque élevée) et dicotylédones (tomate) ont été sélectionnées. Nous avons comparé la phytodisponibilité de plusieurs spéciations du cérium : Des NMs de dioxyde de cérium sans enrobage, des NMs de dioxyde de cérium avec un enrobage de citrate, et du sulfate de cérium ($\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_3$), afin de comparer la phytodisponibilité du cérium sous forme de particule et sous forme dissoute. Nous avons exposé les plantes à trois concentrations en CeO_2 dans les sols : 1, 15, et 50 mg.kg^{-1} de sol. La concentration la plus basse correspond aux estimations faites par [Park et al. \(2008\)](#) dans les sols bordant les routes Londoniennes. Lors de la récolte, des racines issues de plantes ayant été exposées aux NMs de CeO_2 ont été prélevées et congelées dans l'azote liquide, afin de déterminer la spéciation du cérium. La plante concernée est la fétuque, cultivée sur les deux sols

Nous avons mis en évidence les points suivants :

- les propriétés des sols sont le principal facteur de régulation de la phytodisponibilité des NMs de CeO_2 . Si le taux d'argile peut augmenter la rétention des particules dans les sols (et limiter l'absorption par la plante), le carbone organique dissous peut favoriser son prélèvement par la plante.
- Dans le cas du sol pauvre en argile, l'enrobage de citrate autour des NMs de CeO_2 va augmenter la phytodisponibilité des particules, grâce à des tailles d'agrégats inférieures à celles des agrégats issus des NMs de CeO_2 non enrobés.
- La sous classe des plantes n'induit pas de différence de phytodisponibilité. Cette absence d'effet de la sous classe des plantes, contrairement à ce que l'on peut trouver dans la

littérature, peut s'expliquer dans notre cas par l'absence de différence d'architecture racinaire lorsque les plantes sont cultivées en RHIZOtest. Le dispositif permet d'uniformiser la surface de contact entre le sol et la plante, quelle que soit la masse ou la structure racinaire.

- L'utilisation du RHIZOtest nous a également permis d'observer une accumulation de cérium dans les plantes à la concentration d'exposition la plus faible (1 mg.kg^{-1}), sur le sol ayant le taux d'argile le plus bas.
- La spectroscopie par rayon X de ces échantillons a mis en évidence un état d'oxydation du cérium similaire entre les NMs de CeO_2 et le cérium en interaction avec les racines.

Cette étude nous a permis d'établir une première hiérarchie des facteurs environnementaux ayant un effet sur la phytodisponibilité des NMs de CeO_2 . Nous avons également mis en évidence que le RHIZOtest pouvait constituer un outil efficace d'évaluation de la phytodisponibilité des NMs, ayant une sensibilité aux basses concentrations d'exposition, ce qui permet de mettre en évidence l'impact de plusieurs facteurs environnementaux dans des conditions proches d'une situation réaliste.

Ces travaux sont décrits dans le premier article intitulé « Evidences of soil properties and organic coating driven-phytoavailability of cerium oxide nanoparticles », qui a été publié dans le journal Environmental Science and Technology. L'article est présenté dans la [partie II.2](#). La rubrique « Supporting Information » de ces travaux est présentée dans l'[Annexe II](#).

II.2 Evidence that soil properties and organic drive the phytoavailability of cerium oxide nanoparticles

Evidence that soil properties and organic coating drive the phytoavailability of cerium oxide nanoparticles

Clément Layet^{1,2}, Mélanie Auffan^{1,2}, Catherine Santaella^{2,3}, Claire Chevassus-Rosset⁴, Mélanie Montes⁴, Philippe Ortet³, Mohamed Barakat³, Blanche Collin^{1,2}, Samuel Legros⁵, Matthieu N. Bravin⁶, Bernard Angeletti¹, Isabelle Kieffer⁷, Olivier Proux⁷, Jean-Louis Hazemann⁸, Emmanuel Doelsch^{4*}

(1) Aix Marseille Univ, CNRS, IRD, Coll de France, CEREGE UM34, 13545 Aix en Provence, France.

(2) iCEINT, International Center for the Environmental Implications of NanoTechnologies, CNRS - Duke university, Europôle de l'Arbois, 13545 Aix-en-Provence, France.

(3) Aix Marseille Univ, CEA, CNRS, UMR7265, LEMIRE, Laboratoire d'Ecologie Microbienne de la Rhizosphère et Environnement extrêmes, ECCOREV FR3098, F-13108 St Paul Les Durance, France

(4) CIRAD, UPR Recyclage et risque, F-34398 Montpellier, France.

(5) CIRAD, UPR Recyclage et risque, 18524 Dakar, Senegal.

(6) CIRAD, UPR Recyclage et risque, F-97408, Saint-Denis, Réunion, France.

(7) OSUG, UMS 832 CNRS - Univ. Grenoble Alpes, F-38041 Grenoble, France

(8) Inst. Néel, UPR 2940 CNRS - Univ. Grenoble Alpes, F-38000 Grenoble, France

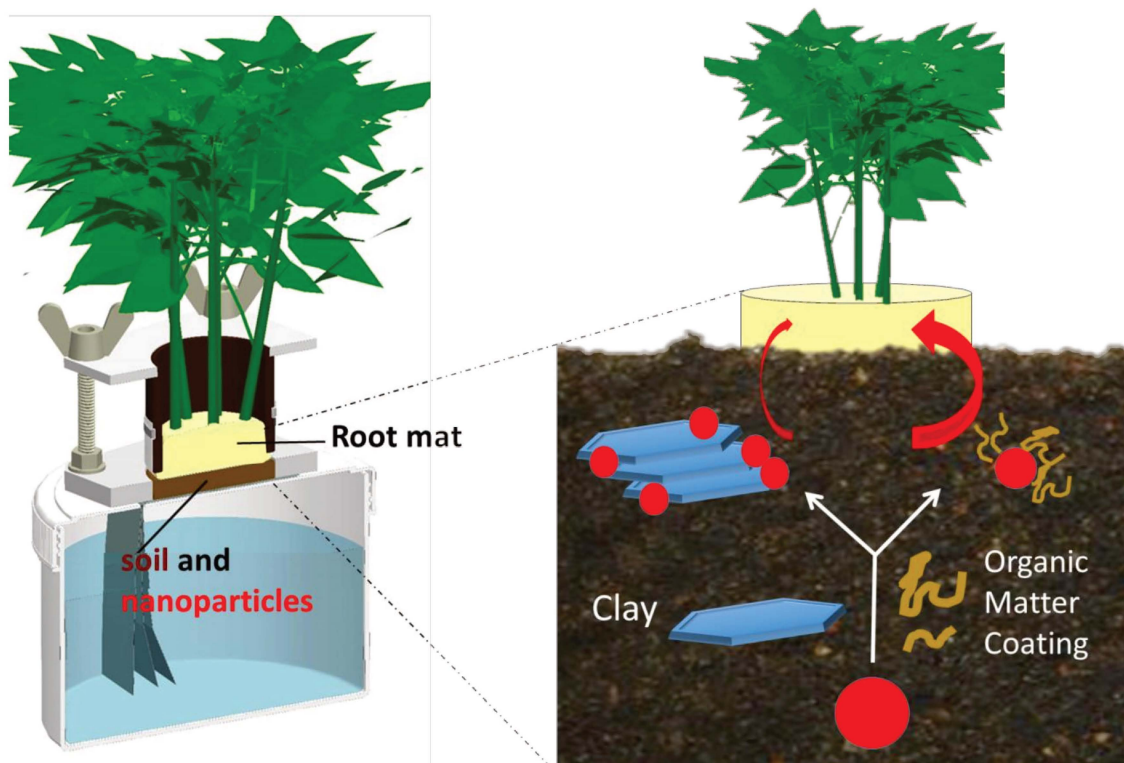
* Corresponding author: Emmanuel Doelsch doelsch@cirad.fr

ABSTRACT

The ISO-standardized RHIZOtest is used here for the first time to decipher how plant species, soil properties, physical-chemical properties of the nanoparticles and their transformation regulate the phytoavailability of nanoparticles. Two plants, tomato and fescue, were exposed to two soils with contrasted properties: a sandy soil poor in organic matter and a clay soil rich in organic matter, both contaminated with 1, 15, and 50 mg.kg⁻¹ of dissolved Ce₂(SO₄)₃, bare and citrate-coated CeO₂ nanoparticles. All the results demonstrate that two antagonistic soil properties controlled Ce uptake. The clay fraction enhanced the retention of the CeO₂ nanoparticles and hence reduced Ce uptake, whereas the organic matter content enhanced Ce uptake. Moreover, in the soil poor in organic matter, the organic citrate coating significantly enhanced the phytoavailability of the cerium by forming smaller aggregates thereby facilitating the transport of nanoparticles to the roots. By getting rid of the dissimilarities between the root systems of the different plants and normalizing the surfaces exposed to nanoparticles, the RHIZOtest demonstrated that the species of plant did not drive the phytoavailability, and provided evidence for soil-plant transfers at concentrations lower than those usually cited in the literature and closer to predicted environmental concentrations.

Keywords: nanomaterials, phytoavailability, soils, plants, speciation, clays, organic matter, cerium, uncoated

ABSTRACT ART



INTRODUCTION

Whether nanoparticles (NPs) are intentionally applied to soils as nano-enabled agrichemicals, or unintentionally deposited through atmospheric pollution or land-application of biosolids, they can interact with plants used as animal feed or human food. Processes for plant uptake, accumulation, and translocation have been recently reviewed ([Schwab et al., 2016](#)) and NPs including carbon nanotubes, Ag, Au, TiO₂, CeO₂, ZnO, have been the focus of several plant uptake studies. Among these, CeO₂ NPs are predicted to be released into the terrestrial environment by several authors ([Gottschalk et al., 2015](#); [Johnson and Park, 2012](#); [Liu and Cohen, 2014](#); [Meesters et al., 2016](#); [Park et al., 2008](#)) with concentrations in soils ranging from ng.kg⁻¹ to mg.kg⁻¹ (figure 1). The highest predicted soil concentrations (0.28-1.12 mg.kg⁻¹) were modelled along a UK highway (at a distance of 26 m and of 96 m from the edge of the highway) assuming CeO₂ accumulation over a 40-yr period ([Park et al., 2008](#)). The lowest soil concentrations were modelled after monitoring accumulation over a 14-yr period in Denmark (0.00001-0.0051 mg.kg⁻¹) ([Gottschalk et al., 2015](#)) and over a 1-yr period in the Los Angeles region (0.000072 mg.kg⁻¹) ([Liu and Cohen, 2014](#)). Several studies have focused on the uptake of coated or bare CeO₂ NPs in plants under different exposure conditions (hydroponics, standardized sands, natural soils) and species (cucumber, tomato, soybean, radish, etc.).

In hydroponics, with doses ranging from 0.1 to 4 000 mg.L⁻¹ of CeO₂ (figure 1, table S1), the authors showed that CeO₂ NPs were taken up by plants and altered the development of both roots and shoots ([Lopez-Moreno et al., 2010a](#); [Schwabe et al., 2013](#)). Translocation of CeO₂ NPs to shoots was also reported with a partial reduction of cerium (Ce(III)) in shoots and leaves ([Zhang et al., 2012](#)). Ce uptake has been reported to vary with the plant species, with a higher translocation rate in dicotyledons than in monocotyledons ([Schwabe et al., 2013](#)). Such different NP uptake in monocots and dicots could be due to different vasculatures and structural features as a tap root system in dicots vs. a fibrous root system in monocots, but also to greater cation binding capacity in dicots ([Guigues et al., 2014](#)). Besides of structural differences, monocots and dicots also differentiate by their exudation profiles related to P and Fe uptake ([Dotaniya and Meena, 2015](#); [Yang et al., 2007](#)). However, two main drawbacks question the results of these studies performed using hydroponics: the effects were observed at high CeO₂ concentrations and in absence of soil.

Recently significant efforts have been made to obtain information on the possible mechanisms behind plant uptake of CeO₂ NPs in contaminated sands and soils (figure 1). A wide range of CeO₂ NP concentrations was used in these studies (from 1.3 to 2 000 mg.kg⁻¹ for soils, table S1). It is worth noting that no evidence for CeO₂ NPs uptake was observed at the lowest concentrations (i.e. from 1.3 to 62.5 mg.kg⁻¹) in soils (figure 1). Evidence for significant uptake of CeO₂ NPs was only found above 100 mg.kg⁻¹ (e.g. in soybean roots and nodules ([Priester et al., 2012](#)) or in roots and shoots of corn plants [Zhao et al. \(2012\)](#) exposed to 100 mg.kg⁻¹ of CeO₂ NPs). Despite these increased efforts, very few studies have focused on other possible drivers that control plant uptake of CeO₂ NPs, e.g. soil

properties. In one, [Zhang et al. \(2017\)](#) studied soil fractionation and uptake of CeO₂ NPs by radish in two types of soil (loamy sand soil and silty loam soil). Using chemical extraction, the soil fractionation of Ce differed slightly in the two soils, mainly the oxidizable fraction (i.e. Ce bound to organic matter), but a similar positive linear correlation was observed between the Ce concentration in the radish root and the sum of exchangeable, reducible and oxidizable fractions of Ce. From this study, it is not clear which soil parameters control the transfer of CeO₂ NPs to plants, i.e. their bioavailability to plants. However, the study highlighted the gap between chemical measurements and biological effects ([Harmsen, 2007](#)) and the importance of identifying the processes that determine the phytoavailability of NPs.

A general definition of contaminant bioavailability in soils was recently proposed ([Harmsen, 2007](#); [ISO 17402, 2008](#)), according to which bioavailability to plants has three components: (i) the availability of the contaminant in the soil, (ii) the phytoavailability, which refers to the flux of contaminants acquired by the roots either by adsorption onto the root apoplast or by absorption through the root symplast and (iii) the toxicological phytoavailability, which refers to the accumulation and/or the toxic effects of the contaminants in the plant. This definition emphasizes how complex it is to assess the phytoavailability of NPs, which is driven by many processes ranging from soil properties (adsorption/desorption at the surface of mineral phases, dissolution/precipitation in the pore water, interactions with natural organic matter, and microbiota), time and the target plant.

In the present study, we used the ISO-standardized RHIZOtest ([Bravin et al., 2010](#); [ISO 16198, 2015](#)) to study the transfer of NPs from the soil to the plant. The RHIZOtest was developed to investigate the role of root-induced chemical processes as a driver of trace element dynamics in the rhizosphere and their phytoavailability. This biotest is based on a root-mat approach that enables close contact between the roots and the soil but prevents the roots from penetrating the soil layer, because the roots and soil are separated by a 30 µm polyamide mesh. This set up maintains biological and chemical interactions at the soil-root interface, while enabling easy recovery of the rhizosphere (i.e. the volume of soil directly affected by root activities) and the whole plants. Here, the soil layer affected by root activities during the culture period is considered as the rhizosphere.

With the RHIZOtest, we deciphered how plant species (monocot vs. dicot), soil properties (pH, dissolved organic carbon content, cationic exchange capacity, clay content), the physical-chemical properties of bare or coated NPs, and transformations (reductive dissolution and/or adsorption on soil components) regulate NP phytoavailability. Two soils with contrasted properties (a sandy soil poor in organic matter (OM) and a clay soil rich in OM) were contaminated with 1, 15, and 50 mg.kg⁻¹ of dissolved Ce₂(SO₄)₃, bare and citrate-coated CeO₂ NPs. The lowest concentration was selected based on the range of predicted environmental concentrations estimated by [Park et al. \(2008\)](#) and the highest concentrations were selected in order to be above the limits of detection of spectroscopic techniques.

The phytoavailability of cerium for the monocot *Festuca arundinacea* and the dicot *Solanum lycopersicum* was then studied.

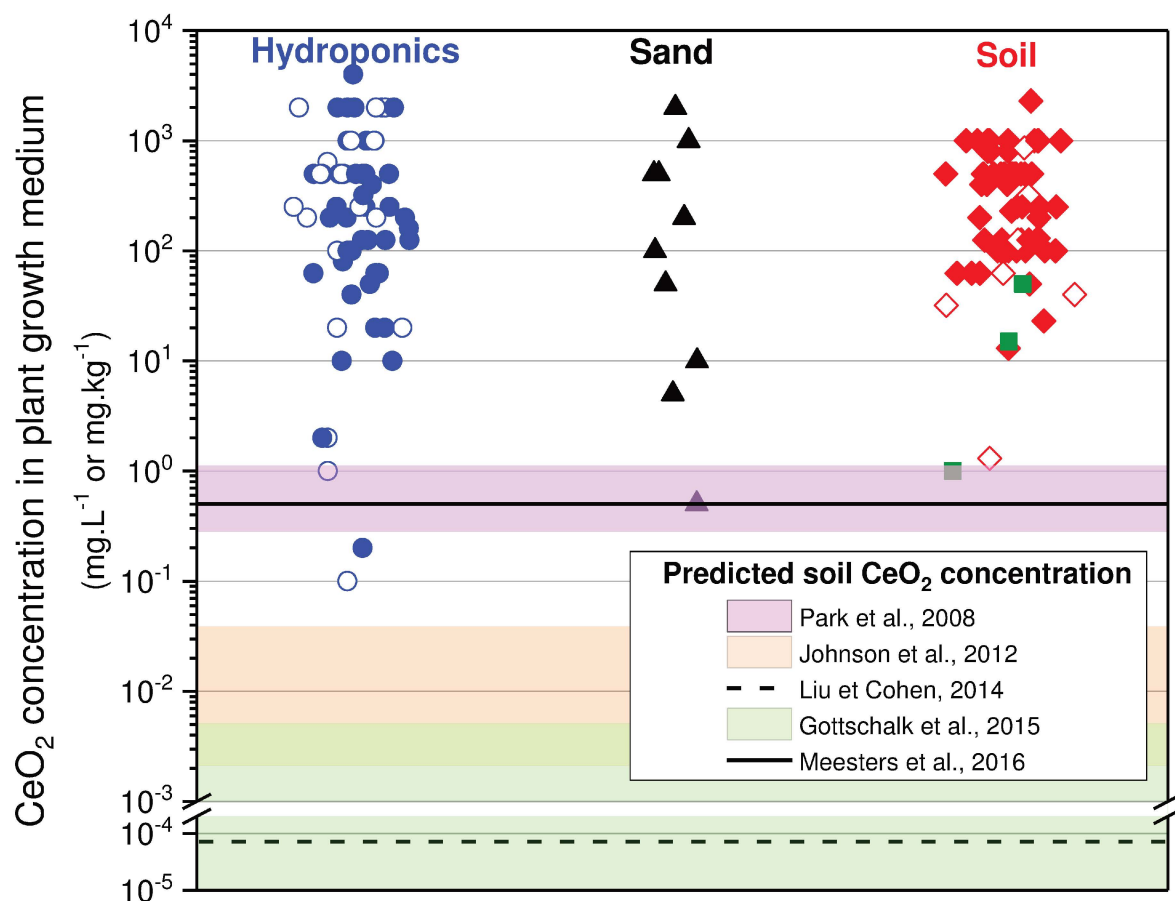


Figure 1. Comparison of exposure CeO_2 NP concentrations used in different plant growth media (hydroponics, sand and soil) with predicted CeO_2 NP concentrations in the soil. Full symbols CeO_2 NP uptake was significantly different from control. Empty symbols indicate no significant difference in CeO_2 NP uptake from controls. Green squares represent the results of the present study. All references and data are reported in Supporting Information (table S1).

MATERIALS AND METHODS

CeO_2 nanoparticles and dissolved Ce

Citrate-coated CeO_2 NPs are commercially available under the trade name NanobykTM (Byk Additives & Instruments, Germany). They are crystallites of cerianite whose average size is 3.9 ± 1.8 nm measured with a transmission electronic microscope (TEM). In the stock suspension, the

distribution of hydrodynamic diameters is centered on 8 nm with size ranged between 4 and 18 nm. Their zeta potential was negative (-40 ± 5 mV) from pH 3 to 10 due to the negatively-charged citrate coating ([Auffan et al., 2014](#)). The purchased suspension contained 2.2×10^2 g.L⁻¹ of CeO₂ in equilibrium with 5.1 ± 0.3 g.L⁻¹ of citrate ([Tella et al., 2014](#)).

Bare CeO₂ NPs are also commercially available (Rhodia, France). They are made of crystallites of cerianite whose average size measured by TEM is 3 ± 1 nm. In the stock suspension, the distribution of hydrodynamic diameters is centered on 8 nm with size ranged between 4 and 15 nm, and the point of zero charge was estimated between pH 7 and 7.5 ([Tella et al., 2014](#)).

Dissolved cerium solution was obtained from Ce₂(SO₄)₃ (Sigma Aldrich, 99.99% trace metal basis) dissolved in ultrapure water.

Soil characteristics and treatments

Two soils were selected for their contrasted physical-chemical properties (table S2). A sandy soil was sampled at a depth of from 0 to 20 cm in a periurban market gardening plot located northwest of Dakar (Pikine area, Senegal). This soil is classified as an Arenosol ([Hodomihou et al., 2016](#)), mainly composed of silica sands (89 ± 24 %) and characterized by an alkaline pH (8.6 ± 0.3), low total organic carbon content (0.51 ± 0.12 %), and a low cation exchange capacity (2.1 ± 0.22 cmol.kg⁻¹).

The clay soil was sampled at La Guiche (Saône-et-Loire area, France). This soil is classified as a Brunisol ([Baize and Girard, 2008](#)) originating from alluvium from the River Recordaine. The land is used as pasture. In contrast with the sandy soil, the clay soil is characterized by a high clay fraction (47.9 ± 2.8 %) and a slightly acid pH (6.2 ± 0.3), a high total organic carbon content (3.7 ± 0.2 %), and a high CEC (21.1 ± 2.0 cmol.kg⁻¹).

The two soils were treated with coated and bare CeO₂ NPs suspensions and dissolved cerium solution with 1, 15, and 50 mg of CeO₂ per kg of soil (dry mass). The lowest concentration was selected based on the range of predicted environmental concentrations estimated by ([Park et al., 2008](#)).

Plants selected

Tall fescue (*Festuca arundinacea*, cv. Callina), a monocot plant, came from R.A.G.T semences, Rodez, France. Tomato (*Solanum lycopersicum*, cv. Fline), a dicot plant, was provided by Gautier semences, Eyragues, France.

RHIZOtest experiment

The experimental procedure is described in detail elsewhere ([Bravin et al., 2010](#); [ISO 16198, 2015](#)). Briefly, the RHIZOtest is a two-step procedure (Figure S1). The plant seedlings were first grown (preculture period) for 14 days in hydroponics in a cylinder closed at the bottom with a 30- μm polyamide mesh to promote the development of a dense, planar root mat. In the second step (culture period), the plants were firmly pressed down on a 6 mm-thick layer of soil sieved to 2 mm for a period of eight days. Immediately preceding contact between plant and soil, 100 μL of cerium solution or suspension (as NPs or in dissolved form) were added at the soil surface (the surface area of the root mat in contact with soil is equal to 12.6 cm^2). For each condition (plant species \times cerium treatment \times concentration \times soil type), four replicates were performed, representing a total of 160 plant pots.

The whole RHIZOtest experiment was conducted in a growth chamber with controlled climatic conditions (16 h day, 200-400 μmol of photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 75% relative humidity and a temperature of 25°C; 8 h night, 70% relative humidity and a temperature of 20°C).

At the end of the culture period, the whole plants were harvested and dried at 50°C to determine their biomass. Next, the plants were burned for two hours in a platinum cup at 500 °C. The ashes were mixed with a few drops of pure water and 2 mL of nitric acid (6 mol.L⁻¹), the solution was filtrated using ashless filter paper in a volumetric flask. The filter containing the residue was burned for 30 min at 500 °C, moistened with few drops of ultra-pure water, mixed with 2 mL of concentrated hydrofluoric acid and boiled on a hot plate until evaporation. The residue was mixed with few drops of pure water and 2 mL of nitric acid (6 mol.L⁻¹), and the solution was transferred to the same volumetric flask, which was topped up to the gauge level with ultra-pure water. A set of control plants was harvested at the end of the preculture period in hydroponics to determine the pools of cerium in the plants before exposure to soil.

Ce concentrations and fluxes in plants

The Ce concentrations were determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry (NexIon 300X, PerkinElmer). For quality control, in-house reference samples (palm tree leaves) and certified samples (strawberry leaves, reference LGC7162, LGC) were used every 20 samples and each analysis was conducted in triplicate. The measurement uncertainty was 10%.

The flux ($\text{ng}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) of cerium taken up in whole plants (roots and shoots) during the culture period can be calculated according to the following equation 1:

$$F = \frac{[(C_f \times m_f) - (C_p \times m_p)]}{S \times t}$$

where C_f is the concentration of cerium in the plant at the end of the culture period;

m_f is the dry biomass of plants at the end of the culture period;
 C_p is the concentration of cerium in the control plant pots at the end of the preculture period;
 m_p is the mean dry biomass of roots of control plant pots at the end of the preculture period;
 S is the surface area of the root mat in contact with the soil;
 t is the duration of the culture period.

Analysis of the soil solution

At plant harvest, the soil in each plant pot was collected. A surrogate of soil solution was recovered by soil extraction (soil:water ratio=1:10) with the nutrient solution (except KH_2PO_4 chemical reagents to avoid the complexation of cerium by phosphates). The mixture was shaken in a rotary shaker set at 16 rpm for 45 min and then centrifuged for 20 min at 4 000 g. The soil solution samples were split into three aliquots. The first untreated and unfiltered aliquot was used for pH analyses. The remaining aliquots were filtered at 0.22 μm (polyethersulfone membrane filter). The second aliquot was acidified with 65% nitric acid (for trace analysis Sigma Adrich) to quantify the concentration of Ce in the soil solution using ICP-MS spectrometry. The third aliquot was mixed with 10 μL sodium azide (final concentration in the aliquot of $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) and used to quantify dissolved organic carbon content (TOC-L CSH, Shimadzu). The last two aliquots were kept at 4 °C until analysis.

Cerium speciation in roots

At harvest, roots exposed to the highest concentration of CeO_2 NPs (50 mg.kg^{-1} soil) were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C before X-ray absorption spectroscopy (XAS) analyses at the cerium L_3 -edge (5723 eV). Frozen roots were ground and pressed into pellets in liquid N_2 (77 K), and kept frozen until X-ray absorption near edge structure (XANES) at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, France). The most concentrated samples ($>50 \text{ mg.kg}^{-1}$ roots) were analyzed in conventional fluorescence mode on the FAME beamline (BM30b) using a Canberra 30-element solid state detector that first collects the fluorescence photons and later electronically separates them by energy. The samples with the lowest concentrations ($<50 \text{ mg.kg}^{-1}$ roots) were analyzed in high energy resolution detected fluorescence mode (HERDF) on the FAME-UHD beamline (BM16) using a crystal analyzer spectrometer (CAS). With CAS, the photons are first optically selected in energy (Bragg scattering) and later collected by a detector, thereby allowing a higher detection limit ([Hazemann et al., 2009](#); [Llorens et al., 2012](#); [Proux et al., 2017](#)).

To avoid beam damage and obtain representative averaged spectra, the frozen pellets were analyzed at 10 K using a He cryostat. All XANES spectra were the sum of 3 to 12 scans. Normalization and

data reduction was performed using IFFEFIT software package ([Ravel and Newville, 2005](#)). Initial bare and coated CeO₂-NPs, micron-sized CeO₂ and Ce(III)-acetate, Ce(III)-oxalate, Ce(III)-cysteine were used as Ce(IV) and Ce(III) reference samples. Linear combination fittings were performed to determine the ratio of Ce(III) to Ce(IV) in our samples.

Statistics

Principal component analysis (PCA) was used to visualize the dataset and to reduce the dimensionality by projecting each sample onto the two first principal components ([Ringner, 2008](#)). PCA was performed on 160 observations, each corresponding to an individual RHIZOtest experiment. The factors (levels) were plant species (fescue, tomato), soil types (sandy and clay), treatments (Ce₂(SO₄)₃, bare or citrate-coated CeO₂ NPs), and concentrations (0, 1, 15, 50 mg.kg⁻¹). The variables of interest were Ce flux and [Ce], pH and DOC in the soil solution. As the variables were measured in different units, they were centered and scaled to unit variance. Analyses were carried out in the R statistical environment ([Team, 2011](#)) using the ade4 ([Thioulouse and Dray, 2007](#)) and adegraphics packages ([Dray et al., 2017](#)). Differences among groups with multiple response variables were assessed using permutation based multivariate analysis of variance (PERMANOVA, 1000 permutations) in Vegan ([Oksanen et al., 2013](#)). PERMANOVA partitions the variance as does ANOVA, but can be applied even if the data distribution is non-normal.

The distribution of the investigated variables and residues was tested for normality using Shapiro-Wilk's test and for homoscedasticity using Levene's test. As the Ce flux fitted a non-normal distribution, we used a non-parametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test in the R environment ([Team, 2011](#)) to compare the Ce flux among the treatment groups. The p-values were corrected for false discovery rates due to multiple post-hoc comparisons using the Benjamini-Hochberg (BH) method ([Benjamini and Hochberg, 1995](#)) p-values or BH-corrected Dunn's post hoc test p-values under 0.05 were considered to be statistically significant.

Simple regression was implemented in StatGraphics Centurion XVI.II to describe the relationships between the outcome variable Ce flux and the predictor variables Ce concentration applied or in soil solution among the treatment groups. The lack of fit test was used to assess whether the selected model adequately described the observed data. The Durbin-Watson statistic tested the residuals to determine any significant autocorrelation based on the order in which they occur in the data file.

RESULTS AND DISCUSSION

Soil type rather than plant species drives Ce phytoavailability

Principal component analysis (PCA) was used to examine the underlying structure of the individuals (individual stands for the whole dataset generated by a single RHIZOtest experiment) and the interrelations among the variables. The two first principal components PC1 and PC2 accounted for 44.14% and 29.62% of the variability, respectively. The score plot (figure 2a) shows the two groups clustered on the PC1 axis, explained by the type of soil, and two groups on the PC2 axis (figure 2b), driven by plant species. The loading plot (figure 2c) shows that Ce flux was positively correlated with the concentration of Ce in the soil solution, while the Ce flux was negatively correlated with DOC. None of the three were correlated with soil pH or plant biomass. The flux of Ce measured in plants, DOC and the concentration of Ce in the soil solution were retained as explanatory variables of the segregation of the individuals according to the nature of the soil, while pH and plant mass explained the clustering of the dataset according to the type of plant.

To examine the significance of the factors (plant, soil, treatment, concentration applied) that explained the variables, we used a permutational distance-based multivariate analysis of variance (PERMANOVA). PERMANOVA analysis (table S3) revealed significant clustering based on concentration ($F=180.38$; $p < 0.001$), soil type ($F=71.79$; $p < 0.001$), and treatment ($F=14.62$; $p < 0.001$) but not on plant species ($F=0.88$; $p=0.37$).

The effect of the type of Ce, i.e. nanoparticles vs. soluble forms of Ce, such as cerium sulfate, was analyzed by PERMANOVA on the set of data deleted from the control treatments (table S4). The variables, concentration, soil, form of Ce, and treatment significantly clustered the data ($F=146.09$, $p < 0.0001$; $F=49.9$, $p < 0.0001$; $F=21.9$, $p < 0.001$ and $F=11.6$, $p < 0.003$, respectively), whereas plant species did not ($F=0.36$, $p=0.571$). Since plant species did not contribute significantly to the variability of the whole set of variables, and especially to Ce flux, unless specified otherwise, only the data on fescue is referred to in the rest of the article.

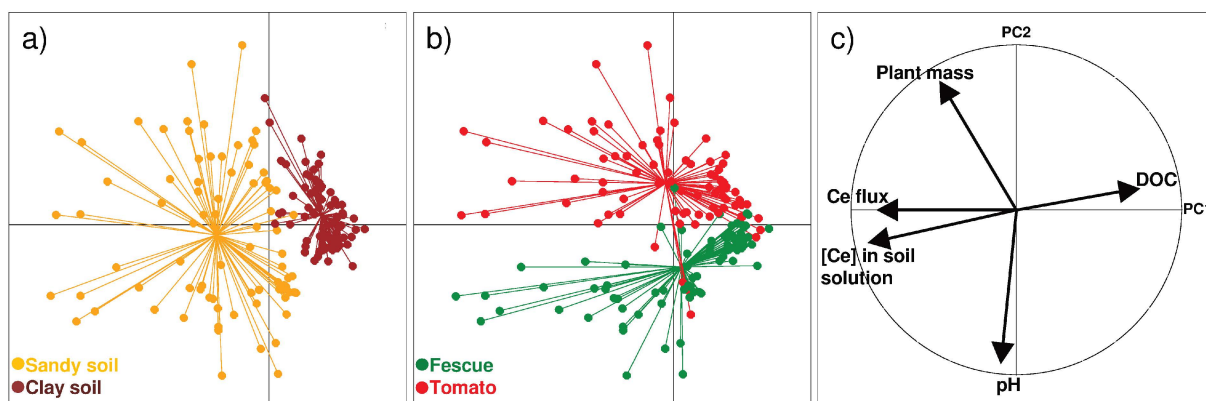


Figure 2. Principal component analysis of the dataset. The two first principal components PC1 and PC2 explained 44.14% and 29.62% of the variability, respectively. Score plots showing clustering of the individuals according to soil type on PC1 (a) and plant species on PC2 (b). The correlation loading plot (c) shows the relationships between the response variables in the space of the first two components.

Antagonistic effects of clay fractions and organic matter on Ce phytoavailability

Figure 3 shows the Ce fluxes measured in fescue for all treatments, concentrations, and soils. Figure 4 shows the relationship between the Ce fluxes and the concentration of Ce in the soil solution (figure S2). Three major patterns can be distinguished, irrespective of the treatments ($\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_3$, bare or coated NPs).

First, the Ce flux was linearly related to the initial concentration of Ce in the soil. The correlation coefficient (0.75) indicated a moderately strong relationship between the variables ($p < 0.001$), emphasizing that the Ce flux is proportional to the initial Ce concentration.

The second pattern is related to soil type-dependent Ce fluxes. Higher Ce fluxes were measured in sandy soil than in clay soil. For example, the Ce fluxes in fescue growing in clay soil exposed to 1, 15 and 50 mg.kg^{-1} of coated CeO_2 NPs (1.9 ± 0.81 , 8.8 ± 1.3 and 34 ± 13 $\text{ng.m}^2.\text{s}^{-1}$ respectively) were respectively 71%, 76% and 79% lower than the Ce fluxes measured in fescue growing in the sandy soil.

The third pattern highlights the linear relationship (figure 4) between the Ce flux and the Ce concentration in the soil solution ($R^2=0.69$, $p < 0.0001$ and $R^2=0.67$, $p < 0.0001$ for clay soil and sandy soil, respectively). The slope coefficient modeled for clay soil was 6.7 times higher than the one modeled for sandy soil. Hence, for the same flux of Ce in plants, the concentration of Ce in soil solution was 6.7 fold higher in the sandy than in the clayey soil.

[Cornelis et al. \(2011\)](#) investigated the main mechanisms determining the retention of CeO₂ NPs in 16 different soils. According to their findings, the percentage of clay was the main physical-chemical driver that determines the CeO₂ NPs retention way ahead of the concentration of phosphate or the pH of the solution (52% of the total sum of squares was accounted for by the percentage of clay in the soils, 14% by the concentration of phosphate and 6% by the pH). Our soils had markedly different clay percentages (47.9% and 1.6% respectively, table S2), which explains the significant differences in Ce fluxes measured in both soils, irrespective of the treatment. This suggests that in our experimental conditions, the clay fraction controlled the retention and the phytoavailability of the CeO₂ NPs.

Surprisingly, the slope of the regression line modeled for clay soil was steeper than the slope modeled for sandy soil (Figure 3). In our soils, not only the percentage of clays were contrasted but also the OM contents (table S2). Hence, the ability of fescue to take up cerium from an OM rich-clay soil is higher than from an OM poor-sandy soil. Recently, two studies provided new evidence that soil organic matter content controls the phytoavailability of CeO₂ NPs. Both studies compared Ce uptake in corn ([Zhao et al., 2012](#)) and kidney bean ([Majumdar et al., 2016](#)) plants exposed to CeO₂ NPs in a soil naturally low in organic matter compared with soil enriched in organic matter (i.e., the same natural soil amended with potting mix). The accumulation of Ce in corn roots was higher in the soil enriched in organic matter than in the soil with low organic matter content but the accumulation of Ce in kidney bean roots did not depend on the type of soil. The authors suggested that organic matter enhanced the accumulation of CeO₂ NPs on the root surface of corn plants. Organic matter tends to coat the NPs, limiting their homo-aggregation or hetero-aggregation with soil components, thereby rendering CeO₂ NPs more phytoavailable.

All our results lead us to conclude that two antagonistic soil properties controlled the Ce uptake: the clay fraction enhanced the retention of the CeO₂ NPs and hence reduced Ce uptake, whereas the organic matter content increased Ce uptake.

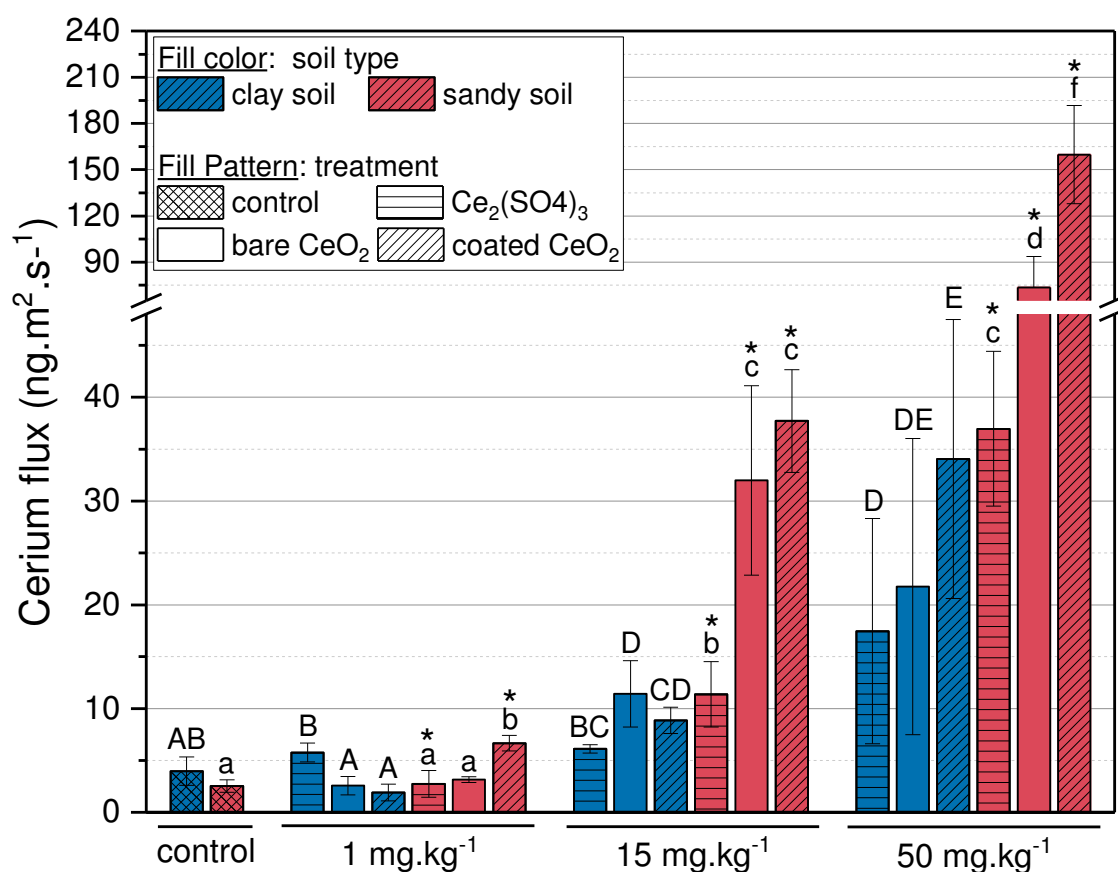


Figure 3. Cerium fluxes in the clay soil and in the sandy soil (n=4, \pm SD) under fescue. Different lower case letters indicate significant differences between modalities (Kruskal-Wallis test) in the sandy soil. Different upper case letters indicate significant differences between modalities (Kruskal-Wallis test) in the clay soil. * indicate significant differences between sandy soil modalities (concentration and treatment) and their analogs on clay soil ($p < 0.05$).

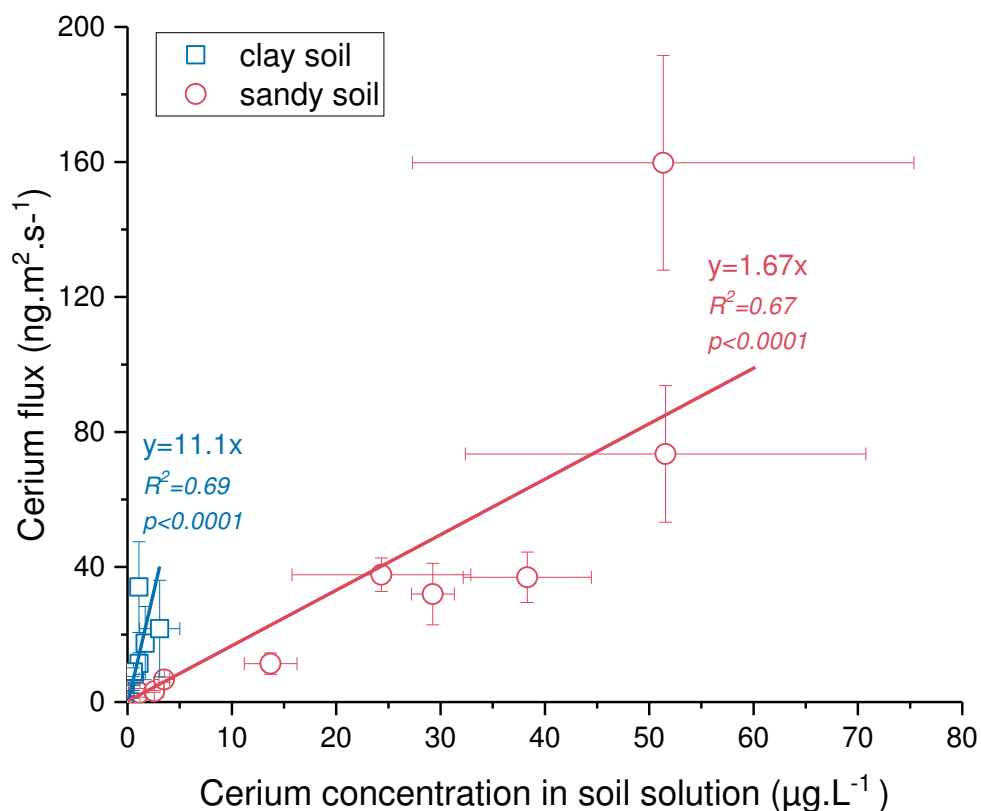


Figure 4. Variations in the flux of cerium as a function of the concentration of cerium in the soil solution in a clay soil and in a sandy soil (n=4, \pm SD) cultivated with fescue.

Organic coating controls the Ce phytoavailability

In soils poor in organic matter (like our sandy soil) a significant role was played by the citrate coating. Ce fluxes were ~ 2.1 times higher (up to 6.6 ± 0.7 ng.m².s⁻¹) with 1 mg.kg⁻¹ and ~ 2.2 times higher (up to 159.8 ± 31.8 ng.m².s⁻¹) with 50 mg.kg⁻¹ following exposure to citrate-coated NPs compared to exposure to bare NPs (figure 3). Consequently, in soils with low organic matter content, the fraction of Ce remaining in the soil solution was more likely to reach the roots in presence of citrate coated NPs. In which case, the organic coating improved the transport of the Ce from the soil solution to the plant root, and its phytoavailability.

We first hypothesized that this higher yield with coated NPs could be due to changes in Ce speciation in solution because of the surface complexation/reductive dissolution with citrate. A few studies ([Cornelis et al., 2011](#); [Tella et al., 2015](#)) have suggested that the complexation of Ce surface atoms with organic acids such as citrate could facilitate the dissolution of CeO₂ NPs and the creation

of Ce(III)–citrate complexes. To validate this hypothesis, we modelled the speciation of bare and citrate-coated CeO₂ in sandy and clay soil solutions geochemically by considering the amounts of cations and anions, pH, Eh, citrate, and DOC in bulk soil solutions (PHREEQC version 2.18 with the databases: MINTEQA and NIST critically selected stability constants of metal complexes). Whatever the conditions (bare or coated CeO₂ NPs in clay or sandy soil solutions) similar speciation was geochemically modelled with 99.99% of CeO₂(s). These results are in agreement with the low solubility expected of ceria nanoparticles ($\log K_{sp(nano-CeO_2)} = -59.3 \pm 0.3$) ([Plakhova et al., 2016](#)). The chemical stability modelled for CeO₂ NPs was experimentally confirmed by XANES of fescue roots exposed in sandy and clay soils (figure 5) for eight days. XANES at the Ce L₃-edge is sensitive to the oxidation state of Ce with one absorption edge for Ce(III) species (e.g. Ce(III)-acetate) and two absorption edges for Ce(IV) (e.g. initially bare and coated CeO₂ NPs). In the present study, XANES spectra of fescue roots exposed to CeO₂ NPs superimposed on the spectra of initially bare and coated CeO₂ NPs indicated that, in our experimental conditions, the atomic structure of the CeO₂ NPs was not significantly affected. All our attempts to include the contribution of Ce(III) in the linear combination fits did not improve the fit residues.

Other studies used bulk XAS to study the speciation of Ce in contact with roots (e.g. ([Lopez-Moreno et al., 2010a](#); [Schwab et al., 2015](#))) and confirm our results. Schwabe et al. ([Schwabe et al., 2015](#)) suggested that this could be due to the uptake of Ce as dissolved Ce(III) followed by reprecipitation into Ce(IV) in planta. Using spatially-resolved XANES analysis, a few authors detected reduced Ce species, for example in soybean pods ([Hernandez-Viezcás et al., 2013](#)) with 12% of Ce(III), and in cucumber ([Zhang et al., 2012](#)) with Ce(III)-PO₄ in the roots and Ce(III)-carboxylate in the shoots. From cucumber exposed in hydroponics up to 2 g.L⁻¹ of CeO₂ NPs, ([Ma et al., 2015](#)) deduced that such a Ce(IV)/Ce(III) transformation occurs at the CeO₂ NP/root exudate interface. In our experimental conditions, with 50 mg.kg⁻¹ of CeO₂ in the soil, both the geochemical modeling and the XANES analysis of the roots failed to validate the hypothesis that the different Ce phytoavailability between coated and bare NPs can be attributed to significantly different Ce speciation in the soil solutions.

The enhanced phytoavailability of the coated NPs could also be related to increased mobility in the soils. Nanoparticle mobility in porous media is known to depend on the properties of porous media (e.g. pore size, composition of the collector), the chemistry of soil solution (e.g. pH, DOC, ionic strength), but also the surface properties and aggregation state of the NPs ([Lecoanet et al., 2004](#); [Solovitch et al., 2010](#)). For instance, ([Guzman et al., 2006](#)) showed that far from the point of zero charge, NPs were more charged, well dispersed, and easily transported to the surface of the plant roots. In the present study, the iso-electric point (IEP) of bare CeO₂ NPs was measured at pH 7 ± 0.5 ([Auffan et al., 2014](#)) which is close to the pH of the soil solution extracted from cultivated sandy (pH~7.1) and clay (pH~6.2) soil. Conversely, due to the pK_a of the citrate coating (pK_a of 3.1, 4.8, and 6.4) ([Martell](#)

and Smith, 1977), coated CeO₂ NPs are negatively charged at these pHs (Auffan et al., 2014). On this IEP basis, coated NPs were expected to be more dispersed and mobile (because of electrostatic repulsion), and more phytoavailable than bare NPs. This was confirmed by DLS with smaller hydrodynamic diameters measured with coated NPs compared to bare NPs in soil solutions (figure S3).

The similar phytoavailability between bare and coated NPs in the clay soil could be attributed to the high concentration of organic matter in the soil (table S2). Like organic acids, amino acids, sugar acid, and siderophores organic matter had a negative structural charge in our pH conditions, and its adsorption on the surface of the NPs could result in the formation of smaller aggregates, thereby could facilitating their transport to the roots (Domingos et al., 2009; Navarro et al., 2008). Organic matter will preferentially adsorb on the surface of neutrally-charged bare CeO₂ NPs but small molecular weight organic acids could also exchange with the citrate at the surface of the coated NPs (Whitley et al., 2013). Both could make bare and coated NPs comparable in terms of electrostatic interactions, as well as in their affinity for the surface of the plant roots.

Finally, to confirm our assumptions, further experiments with soils exhibiting a very wide range of physicochemical properties would be required to confirm the uptake mechanisms of cerium.

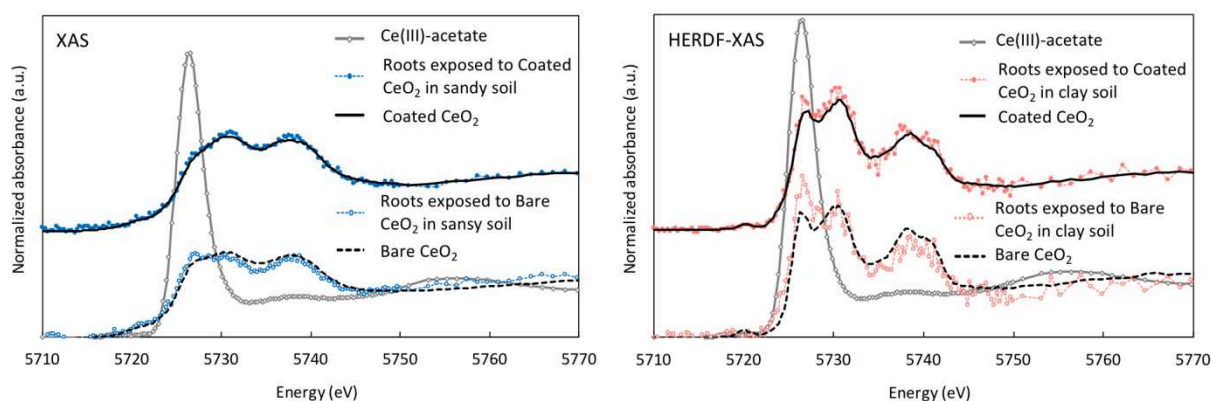


Figure5. XANES at the Ce L₃-edge of fescue roots exposed for 8 days to bare and coated CeO₂ NPs in a sandy soil and in clay. Ce^(III)-citrate, and the initial bare and coated CeO₂ NPs are shown as reference compounds. Roots exposed in sandy soil were analyzed in conventional fluorescence mode (FAME beamline, ESRF) while the roots exposed in clay soil were analyzed in HERDF mode (FAME UHD beamline, ESRF).

RHIZOtest: a sensitive biotest to assess NP phytoavailability

One major advantage of RHIZOtest is that it makes it possible to compare the phytoavailability of NPs without depending on plant mass or on the root-soil surface area (equation 1). Up to now, comparing NP uptake by plants has always been hindered by the dissimilarities in root systems between plants, as contact between the roots and the soil solution varies with the plant and cropping conditions ([Schoonderbeek and Schoute, 1994](#)). For example, previous studies focusing on the phytoavailability of CeO₂ NPs as a function of the plant species, led to contradictory conclusions (e.g. ([Lopez-Moreno et al., 2010a](#); [Schwabe et al., 2013](#))). Some authors ([Lopez-Moreno et al., 2010b](#)) reported higher cerium concentrations in dicots (alfalfa, tomato, cucumber) than in a monocot (corn) exposed to CeO₂ NPs (500 to 4000 mg.L⁻¹) in hydroponics, whereas other authors ([Schwabe et al., 2013](#)) reported higher cerium contents in the roots of a monocot (wheat) and in the shoots for a dicot (pumpkin) exposed to 100 mg.L⁻¹ of CeO₂ NPs in hydroponics. Amongst the differences between these studies (diameter of NPs, plant species, etc.), an issue was that element uptake depends on the extent of the interaction between the root system and the exposure solution. Using the RHIZOtest enabled us to get around these issues and we observed that the physiological differences between a monocot (fescue) and a dicot (tomato) led to a similar uptake of Ce regardless of the treatment and the soil (p=0.37, table S3).

The second advantage of RHIZOtest is its ability to account for root-induced processes that occur in the rhizosphere. Plant roots can alter the chemical properties of the rhizosphere by taking up or releasing a wide range of exudates that are likely to change ionic concentrations, redox potential and pH ([Hinsinger et al., 2009](#)). In sandy soil, fescue and tomato drastically decreased the pH of the rhizosphere relative to the pH of the bulk soil (from -1.1 to -2.2 pH unit, figure 6). In contrast, changes in the pH of the clay soil were slighter with both plants (from +0.1 to -0.3 pH unit). These changes in pH were always more marked in the tomato rhizosphere than in the fescue rhizosphere, irrespective of the soil. Several authors documented the ability of monocots and dicots grown in RHIZOtest to acidify their rhizosphere in slightly acidic and calcareous soils (e.g. ([Bravin et al., 2009](#); [Chaignon et al., 2002](#))). It is highly unlikely that the imbalance between the intake of anions and cations is involved, as nitrate-fed plants (nitrate was provided by nutrient solution during the RHIZOtest experiment, figure S1) commonly alkalinize their rhizosphere following excess intake of anions over cations. Deficiency in P and Fe, root respiration, and organic acid exudation were proposed as alternatively explanations for the pattern of acidification of the rhizosphere. In addition, the lower acidification observed for fescue (a monocot) compared to tomato (a dicot) may be due to the greater ability of monocot/graminaceous species than that of dicots to favor OH⁻ efflux in the rhizosphere in the case of a similar imbalance in the intake of anions and cations ([Jarvis and Robson, 1983](#)). Figure 6 highlights the ability of the RHIZOtest to account for such rhizosphere processes ([Bravin et al., 2010](#)) as root-

induced pH, and thereby supporting our conclusion concerning the absence of differences in the Ce flux between monocots and dicots.

Finally, the RHIZOtest also has the advantage of enabling root systems that are not contaminated by soil particles to be retrieved. This makes it possible to work with a range of NP concentrations lower than those usually cited in the literature and closer to predicted environmental concentrations (figure 1). Even at the lowest concentration tested (1 mg.kg^{-1} soil), the RHIZOtest was sensitive enough to highlight differences in the Ce flux as a function of soil types and of the surface properties of the nanoparticles (figure 3). The RHIZOtest thus appears to be more realistic than classical hydroponic cultures, and more reliable than standard pot experiments with soil to estimate element fluxes after contamination by NPs, especially low concentrations of NPs. This means the RHIZOtest is a promising tool to standardize the assessment of NP-soil-plant transfers.

The RHIZOtest outputs should be however consider as an evaluation of the phytoavailability measured in standardized conditions, which consequently do not per se take into account some important processes as the root system architecture in comparison with pot and field experiments.

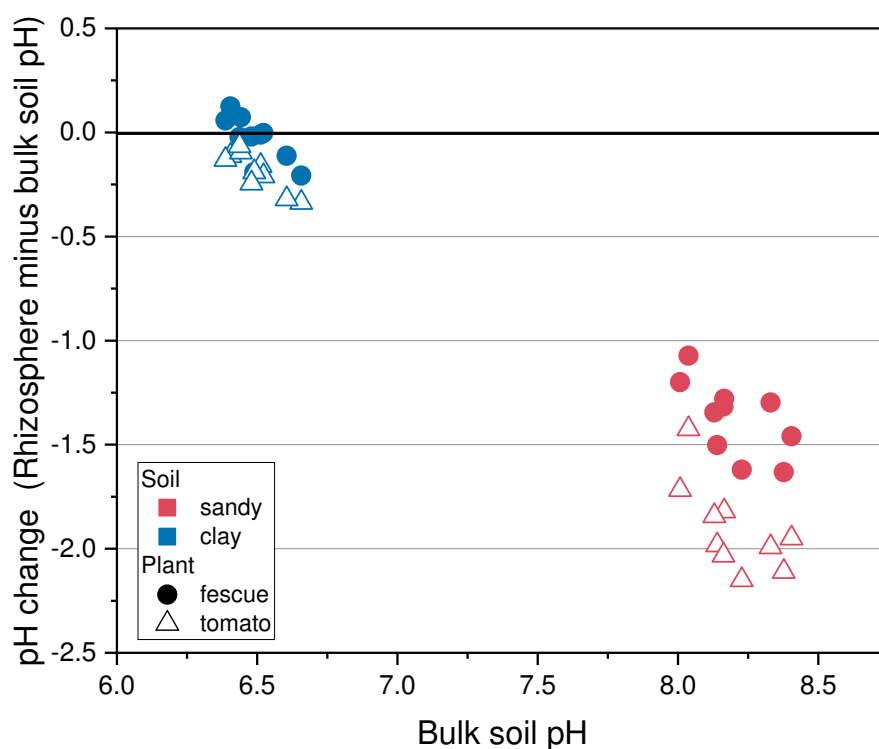


Figure 6. Root-induced changes in pH as a function of bulk soil pH.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the French Environment and Energy Management Agency (ADEME) and Labex Serenade (funded by the «*Investissements d'Avenir*» French Government program of the French National Research Agency (ANR-11-LABX-0064) through the A*MIDEX project (ANR-11-IDEX-0001-02)) for Clément Layet's PhD grant. The authors acknowledge INSU (CNRS) for funding the study via the EC2CO-ECODYN call. The authors acknowledge the CNRS funding for the GDRi iCEINT, and the OSU-Institut Pythéas. The FAME-UHD project is financially supported by the French "grand emprunt" EquipEx (EcoX, ANR-10-EQPX-27-01), the CEA-CNRS CRG consortium and the INSU CNRS institute. We also thank X. Lacan and C. Villefranque from RAGT semences who kindly provided the Tall fescue seeds and the European Synchrotron Radiation Facility for access to the synchrotron radiation facilities.

ASSOCIATED CONTENT

The Supporting Information is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>

Table S1. References and data used in the Figure 1. **Table S2.** Characteristics of the soils. **Table S3.** PERMANOVA on the whole set of data. **Table S4.** PERMANOVA on the set of data expunged from the control treatments (no Ce added). **Figure S1:** The two-step procedure of RHIZOtest. **Figure S2:** Extracted cerium ($\mu\text{g.L}^{-1}$) in clay soil and sandy soil ($n=4$, \pm SD) under fescue. **Figure S3.** Hydrodynamic diameters of the bare and coated CeO_2 in soil solution extracted from fescue cultivated soils. Measurements were performed 10 min after the NPs injection (10 mg.L^{-1}).

REFERENCES

- Auffan, M., Masion, A., Labille, J., Diot, M.-A., Liu, W., Olivi, L., Proux, O., Ziarelli, F., Chaurand, P., Geantet, C., Bottero, J.-Y., and Rose, J. (2014). Long-term aging of a CeO_2 based nanocomposite used for wood protection. *Environmental Pollution* **188**, 1-7.
- Baize, D., and Girard, M.-C. (2008). Référentiel pédologique. *AFES Quae Edition*, 405.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. Roy. Statist. Soc. Ser. B*, **57**, 289–300.
- Bravin, M. N., Marti, A. L., Clairotte, M., and Hinsinger, P. (2009). Rhizosphere alkalisation - a major driver of copper bioavailability over a broad pH range in an acidic, copper-contaminated soil. *Plant and Soil* **318**, 257-268.
- Bravin, M. N., Michaud, A. M., Larabi, B., and Hinsinger, P. (2010). RHIZOtest: A plant-based biotest to account for rhizosphere processes when assessing copper bioavailability. *Environmental Pollution* **158**, 3330-3337.
- Chaignon, V., Bedin, F., and Hinsinger, P. (2002). Copper bioavailability and rhizosphere pH changes as affected by nitrogen supply for tomato and oilseed rape cropped on an acidic and a calcareous soil. *Plant and Soil* **243**, 219-228.

- Cornelis, G., Ryan, B., McLaughlin, M. J., Kirby, J. K., Beak, D., and Chittleborough, D. (2011). Solubility and Batch Retention of CeO₂ Nanoparticles in Soils. *Environmental Science & Technology* **45**, 2777-2782.
- Domingos, R. F., Tufenkji, N., and Wilkinson, K. J. (2009). Aggregation of Titanium Dioxide Nanoparticles: Role of a Fulvic Acid. *Environmental Science & Technology* **43**, 1282-1286.
- Dotaniya, M. L., and Meena, V. D. (2015). Rhizosphere effect on nutrient availability in soil and its uptake by plants: a review. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* **85**, 1-12.
- Dray, S., Dufour, A.-B., and Thioulouse, J. (2017). Analysis of Ecological Data : Exploratory and Euclidean Methods in Environmental Sciences. *R package Version* **1.7-6**.
- Gottschalk, F., Lassen, C., Kjoelholt, J., Christensen, F., and Nowack, B. (2015). Modeling Flows and Concentrations of Nine Engineered Nanomaterials in the Danish Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **12**, 5581-5602.
- Guigues, S., Bravin, M., Garnier, C., Masion, A., and Doelsch, E. (2014). Isolated cell walls exhibit cation binding properties distinct from those of plant roots. *Plant and Soil* **381**, 367-379.
- Guzman, K. A. D., Finnegan, M. P., and Banfield, J. F. (2006). Influence of surface potential on aggregation and transport of titania nanoparticles. *Environmental Science & Technology* **40**, 7688-7693.
- Harmsen, J. (2007). Measuring bioavailability: From a scientific approach to standard methods. *Journal of Environmental Quality* **36**, 1420-1428.
- Hazemann, J. L., Proux, O., Nassif, V., Palancher, H., Lahera, E., Da Silva, C., Braillard, A., Testemale, D., Diot, M. A., Alliot, I., Del Net, W., Manceau, A., Gelebart, F., Morand, M., Dermigny, Q., and Shukla, A. (2009). High-resolution spectroscopy on an X-ray absorption beamline. *Journal of Synchrotron Radiation* **16**, 283-292.
- Hernandez-Viezcas, J. A., Castillo-Michel, H., Andrews, J. C., Cotte, M., Rico, C., Peralta-Videa, J. R., Ge, Y., Priester, J. H., Holden, P. A., and Gardea-Torresdey, J. L. (2013). In Situ Synchrotron X-ray Fluorescence Mapping and Speciation of CeO₂ and ZnO Nanoparticles in Soil Cultivated Soybean (*Glycine max*). *ACS Nano*.
- Hinsinger, P., Bengough, A. G., Vetterlein, D., and Young, I. (2009). Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil* **321**, 117-152.
- Hodomihou, N. R., Feder, F., Masse, D., Agbossou, K. E., Amadji, G. L., Ndour-Badiane, Y., and Doelsch, E. (2016). Diagnosis of periurban Dakar (Senegal) agrosystem contamination by trace elements. *Biotechnologie Agronomie Societe Et Environnement* **20**, 397-407.
- ISO 16198 (2015). Plant-based test to assess the environmental bioavailability of trace elements to plants *In "Soil quality"*, Geneva, Switzerland.
- ISO 17402 (2008). Guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability of contaminants in soil and soil materials. *In "Soil quality"*, Geneva, Switzerland.
- Jarvis, S. C., and Robson, A. D. (1983). The effects of nitrogen nutrition of plants on the development of acidity in western Australian soils. II. Effects of differences in cation/anion balance between plant species grown under non-leaching conditions. *Australian Journal of Agricultural Research* **34**, 355-365.
- Johnson, A. C., and Park, B. (2012). Predicting contamination by the fuel additive cerium oxide engineered nanoparticles within the United Kingdom and the associated risks. *Environmental Toxicology and Chemistry* **31**, 2582-2587.
- Lecoanet, H. F., Bottero, J. Y., and Wiesner, M. R. (2004). Laboratory assessment of the mobility of nanomaterials in porous media. *Environmental Science & Technology* **38**, 5164-5169.
- Liu, H. H., and Cohen, Y. (2014). Multimedia Environmental Distribution of Engineered Nanomaterials. *Environmental Science & Technology* **48**, 3281-3292.
- Llorens, I., Lahera, E., Delnet, W., Proux, O., Braillard, A., Hazemann, J. L., Prat, A., Testemale, D., Dermigny, Q., Gelebart, F., Morand, M., Shukla, A., Bardou, N., Ulrich, O., Arnaud, S., Berar, J. F., Boudet, N., Caillot, B., Chaurand, P., Rose, J., Doelsch, E., Martin, P., and Solari, P. L.

- (2012). High energy resolution five-crystal spectrometer for high quality fluorescence and absorption measurements on an x-ray absorption spectroscopy beamline. *Review of Scientific Instruments* **83**, 9.
- López-Moreno, M. L., de la Rosa, G., Hernández-Viezcas, J. Á., Castillo-Michel, H., Botez, C. E., Peralta-Videa, J. R., and Gardea-Torresdey, J. L. (2010). Evidence of the Differential Biotransformation and Genotoxicity of ZnO and CeO₂ Nanoparticles on Soybean (Glycine max) Plants. *Environmental Science & Technology* **44**, 7315-7320.
- López-Moreno, M. L., de la Rosa, G., Hernández-Viezcas, J. A., Peralta-Videa, J. R., and Gardea-Torresdey, J. L. (2010). X-ray Absorption Spectroscopy (XAS) Corroboration of the Uptake and Storage of CeO₂ Nanoparticles and Assessment of Their Differential Toxicity in Four Edible Plant Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 3689-3693.
- Ma, Y., Zhang, P., Zhang, Z., He, X., Zhang, J., Ding, Y., Zhang, J., Zheng, L., Guo, Z., Zhang, L., Chai, Z., and Zhao, Y. (2015). Where Does the Transformation of Precipitated Ceria Nanoparticles in Hydroponic Plants Take Place? *Environmental Science & Technology* **49**, 10667-10674.
- Majumdar, S., Peralta-Videa, J. R., Trujillo-Reyes, J., Sun, Y., Barrios, A. C., Niu, G., Margez, J. P. F., and Gardea-Torresdey, J. L. (2016). Soil organic matter influences cerium translocation and physiological processes in kidney bean plants exposed to cerium oxide nanoparticles. *Science of The Total Environment* **569–570**, 201-211.
- Martell, A. E., and Smith, R. M. (1977). "Critical stability constants V.3.," Plenum Press, New York.
- Meesters, J. A. J., Quik, J. T. K., Koelmans, A. A., Hendriks, A. J., and van de Meent, D. (2016). Multimedia environmental fate and speciation of engineered nanoparticles: a probabilistic modeling approach. *Environmental Science: Nano* **3**, 715-727.
- Navarro, E., Piccapietra, F., Wagner, B., Marconi, F., Kaegi, R., Odzak, N., Sigg, L., and Behra, R. (2008). Toxicity of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science & Technology* **42**, 8959-8964.
- Oksanen, J. F., Blanchet, G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Henry, M. H. S., Szoecs, E., and Wagner, H. (2013). vegan: Community Ecology Package. *R package Version* **2.4-3**.
- Park, B., Donaldson, K., Duffin, R., Tran, L., Kelly, F., Mudway, I., Morin, J. P., Guest, R., Jenkinson, P., Samaras, Z., Giannouli, M., Kouridis, H., and Martin, P. (2008). Hazard and risk assessment of a nanoparticulate cerium oxide-based diesel fuel additive - A case study. *Inhalation Toxicology* **20**, 547-566.
- Plakhova, T. V., Romanchuk, A. Y., Yakunin, S. N., Dumas, T., Demir, S., Wang, S. A., Minasian, S. G., Shuh, D. K., Tyliczszak, T., Shiryayev, A. A., Egorov, A. V., Ivanov, V. K., and Kalmykov, S. N. (2016). Solubility of Nanocrystalline Cerium Dioxide: Experimental Data and Thermodynamic Modeling. *Journal of Physical Chemistry C* **120**, 22615-22626.
- Priester, J. H., Ge, Y., Mielke, R. E., Horst, A. M., Moritz, S. C., Espinosa, K., Gelb, J., Walker, S. L., Nisbet, R. M., An, Y.-J., Schimel, J. P., Palmer, R. G., Hernandez-Viezcas, J. A., Zhao, L., Gardea-Torresdey, J. L., and Holden, P. A. (2012). Soybean susceptibility to manufactured nanomaterials with evidence for food quality and soil fertility interruption. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, E2451-E2456.
- Proux, O., Lahera, E., Del Net, W., Kieffer, I., Rovezzi, M., Testemale, D., Irar, M., Thomas, S., Aguilar-Tapia, A., Bazarkina, E. F., Prat, A., Tella, M., Auffan, M., Rose, J., and Hazemann, J.-L. (2017). High-Energy Resolution Fluorescence Detected X-Ray Absorption Spectroscopy: A Powerful New Structural Tool in Environmental Biogeochemistry Sciences. *Journal of Environmental Quality*.
- Ravel, B., and Newville, M. (2005). ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. *Journal of Synchrotron Radiation* **12**, 537-541.
- Ringner, M. (2008). What is principal component analysis? *Nat Biotech* **26**, 303-304.
- Schoonderbeek, D., and Schoute, J. F. T. (1994). Root and Root-Soil Contact of Winter-Wheat in Relation to Soil Macroporosity. *Agriculture Ecosystems & Environment* **51**, 89-98.

- Schwab, F., Zhai, G., Kern, M., Turner, A., Schnoor, J. L., and Wiesner, M. R. (2016). Barriers, pathways and processes for uptake, translocation and accumulation of nanomaterials in plants – Critical review. *Nanotoxicology* **10**, 257-278.
- Schwabe, F., Schulin, R., Limbach, L. K., Stark, W., Burge, D., and Nowack, B. (2013). Influence of two types of organic matter on interaction of CeO₂ nanoparticles with plants in hydroponic culture. *Chemosphere* **91**, 512-520.
- Schwabe, F., Tanner, S., Schulin, R., Rotzetter, A., Stark, W., von Quadt, A., and Nowack, B. (2015). Dissolved cerium contributes to uptake of Ce in the presence of differently sized CeO₂-nanoparticles by three crop plants. *Metallomics* **7**, 466-477.
- Solovitch, N., Labille, J., Rose, J., Chaurand, P., Borschneck, D., Wiesner, M. R., and Bottero, J. Y. (2010). Concurrent Aggregation and Deposition of TiO₂ Nanoparticles in a Sandy Porous Media. *Environmental Science & Technology* **44**, 4897-4902.
- Team, R. D. C. (2011). R: A Language and Environment for Statistical Computing. (t. R. F. f. S. Computing, ed.), Vienna, Austria.
- Tella, M., Auffan, M., Brousset, L., Issartel, J., Kieffer, I., Pailles, C., Morel, E., Santaella, C., Angeletti, B., Artells, E., Rose, J., Thiery, A., and Bottero, J.-Y. (2014). Transfer, Transformation, and Impacts of Ceria Nanomaterials in Aquatic Mesocosms Simulating a Pond Ecosystem. *Environmental Science & Technology* **48**, 9004-9013.
- Tella, M., Auffan, M., Brousset, L., Morel, E., Proux, O., Chaneac, C., Angeletti, B., Pailles, C., Artells, E., Santaella, C., Rose, J., Thiery, A., and Bottero, J. Y. (2015). Chronic dosing of a simulated pond ecosystem in indoor aquatic mesocosms: fate and transport of CeO₂ nanoparticles. *Environmental Science-Nano* **2**, 653-663.
- Thioulouse, J., and Dray, S. (2007). Interactive multivariate data analysis in R with the ade4 and ade4TkGUI packages. *Journal of Statistical Software* **22**, 1-14.
- Whitley, A. R., Levard, C., Oostveen, E., Bertsch, P. M., Matocha, C. J., von der Kammer, F., and Unrine, J. M. (2013). Behavior of Ag nanoparticles in soil: Effects of particle surface coating, aging and sewage sludge amendment. *Environmental Pollution* **182**, 141-149.
- Yang, H., Knapp, J., Koirala, P., Rajagopal, D., Peer, W. A., Silbart, L. K., Murphy, A., and Gaxiola, R. A. (2007). Enhanced phosphorus nutrition in monocots and dicots over-expressing a phosphorus-responsive type I H⁺-pyrophosphatase. *Plant biotechnology journal* **5**, 735-745.
- Zhang, P., Ma, Y., Zhang, Z., He, X., Zhang, J., Guo, Z., Tai, R., Zhao, Y., and Chai, Z. (2012). Biotransformation of Ceria Nanoparticles in Cucumber Plants. *ACS Nano* **6**, 9943-9950.
- Zhang, W., Musante, C., White, J. C., Schwab, P., Wang, Q., Ebbs, S. D., and Ma, X. (2017). Bioavailability of cerium oxide nanoparticles to *Raphanus sativus* L. in two soils. *Plant Physiology and Biochemistry* **110**, 185-193.
- Zhao, L., Peralta-Videa, J. R., Varela-Ramirez, A., Castillo-Michel, H., Li, C., Zhang, J., Aguilera, R. J., Keller, A. A., and Gardea-Torresdey, J. L. (2012). Effect of surface coating and organic matter on the uptake of CeO₂ NPs by corn plants grown in soil: Insight into the uptake mechanism. *Journal of Hazardous Materials* **225-226**, 131-138.

Chapitre III : Etude de la phytodisponibilité des nanomatériaux en fonction des propriétés des sols et des nanomatériaux. Deuxième cas d'étude : le dioxyde de titane.

III.1 Résumé de l'étude

Les NMs de dioxyde de titane (TiO_2) figurent parmi les NMs les plus produits dans l'industrie au niveau mondial ([Keller et al., 2013](#); [Vance et al., 2015](#)). Les NMs de TiO_2 sont utilisés pour leurs propriétés spécifiques dans en tant qu'agents photocatalytiques (nettoyage de surface), ou en tant qu'agents absorbants de rayons ultraviolets dans des produits cosmétiques ([Vance et al., 2015](#)). Si l'on se réfère aux cycles de vie des produits contenant des NMs de TiO_2 , ces NMs peuvent être rejetés dans l'environnement. Dans le cas des sols, les NMs de TiO_2 peuvent s'y accumuler via l'épandage de boues de stations d'épuration ou directement par vieillissement des produits (par exemple, l'altération des peintures de revêtement) ([Keller et al., 2013](#)). Les modélisations ont estimé des concentrations de NMs de TiO_2 dans les sols comprises entre $0.085\mu\text{g.kg}^{-1}$, 1.3 mg.kg^{-1} , 18 mg.kg^{-1} et 40 mg.kg^{-1} ([Gottschalk et al., 2015](#); [Gottschalk et al., 2009](#); [Meesters et al., 2016](#); [Sun et al., 2016](#); [Sun et al., 2014](#)). Dans le cadre du devenir des NMs dans l'environnement et dans les chaînes trophiques, plusieurs travaux se sont attelés à la phytodisponibilité des NMs de TiO_2 . Néanmoins, une grande partie de ces études ont utilisé des plantes cultivées et exposées aux NMs en hydroponie. Cette méthode limite l'estimation de la phytodisponibilité dans des conditions réalistes, car nous perdons la possibilité d'interaction entre les différentes composantes du sol (communautés microbiennes, matière organique...) et les NMs de TiO_2 . L'objectif de cette étude était d'évaluer la phytodisponibilité des NMs de TiO_2 en fonction de la nature des sols, et de la forme des NMs.

Dans le précédent chapitre, nous avons vu que le RHIZOtest nous permettait de déterminer l'impact de plusieurs facteurs environnementaux et des paramètres liés aux propriétés des NMs sur leur phytodisponibilité. En revanche, la sous classe des plantes n'a pas eu d'impact significatif sur la phytodisponibilité des NMs. Dans cette première étude, nous avons utilisé des NMs de CeO_2 . Nous avons décidé de modifier deux paramètres dans l'étude de la phytodisponibilité des NMs, le sol (un des principaux facteurs), la concentration d'exposition, et la nature chimique des NMs (NMs de TiO_2). Nous avons utilisé une seule sous classe de plante (fétuque élevée, monocotylédone), afin d'augmenter le nombre de types de sol cultivés. Nous avons utilisé quatre sols ayant un éventail de propriétés distinctes en matière de pH, de capacité d'échange cationique (CEC), de texture et de taux de carbone organique.

Le protocole du RHIZOtest est resté inchangé pour cette étude. Les NMs de TiO_2 étudiés sont des particules d'anatase, de formes et de tailles différentes. Nous avons utilisé des particules sphériques, utilisées en industrie. Nous avons par ailleurs utilisé deux NMs synthétisés au Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris ([Dufour et al., 2015](#)). Il s'agit de deux particules différentes de TiO_2 (anatase), ayant respectivement des formes cubiques (25nm) et cylindrique (250nm). Les concentrations d'exposition aux NMs dans les sols étaient de 1, 15, et 150 mg.kg^{-1} .

Nous avons mis en évidence les points suivants :

- Le flux de titane dans les plantes exposées à la concentration en TiO_2 la plus faible (1 mg.kg^{-1}) n'est pas significativement différent du flux dans les échantillons témoins. Pour des concentrations en TiO_2 de 15 et 150 mg.kg^{-1} , les flux de Ti étaient significativement supérieurs à ceux des échantillons témoins. Pour une concentration en TiO_2 allant de 15 mg.kg^{-1} à 150 mg.kg^{-1} , la valeur du flux de Ti dans des plantes est environ multipliée par trois. Une concentration en Ti plus importante que les témoins dans les tiges a également été observée.
- Le type de sol et la concentration d'exposition au titane régulent de manière significative le flux de Ti dans les plantes. La forme des NMs de TiO_2 n'avait pas d'impact significatif sur le flux de Ti dans les plantes. Néanmoins, la forme des NMs de TiO_2 , ainsi que la nature des sols, avaient un impact significatif sur la biomasse.
- La nature des sols a un impact significatif sur les flux de Ti dans les plantes, mais uniquement à la plus forte concentration d'exposition (150 mg.kg^{-1}). Les sols ayant les taux d'argile les plus importants présentent des flux de Ti les moins importants dans les plantes.

La présence de Ti dans les tiges implique un passage des NMs à travers plusieurs barrières dans l'appareil racinaire. Les pores de ces barrières sont pourtant inférieures à la taille primaire d'une partie des NMs utilisées, ce qui implique une dégradation de ces barrières liée à la génération d'espèce réactives de l'oxygène par les NMs. Il convient de comparer l'activité photocatalytique des NMs en milieu complexe (solution de sol) pour valider la possibilité d'un passage dans les parties aériennes de la plante à cause d'une dégradation de composants de l'appareil racinaire. Ces travaux sont décrits dans l'article intitulé «Phytoavailability of TiO_2 nanoparticles: soil type and nanoparticle shape matters », dans la [partie III.2](#) et feront l'objet d'une prochaine publication. La rubrique « Supporting Information » de ces travaux est présentée dans l'[Annexe III](#).

III.2 Phytoavailability of TiO₂ nanoparticle: soil type and nanoparticle shape matters.

Phytoavailability of TiO₂ nanoparticles: soil type and nanoparticle shape matters

C. Layet^{1,2}, C. Santaella^{2,3}, M. Auffan^{1,2}, C. Chevassus-Rosset⁴, M. Montes⁴, P. Ortet³, M. Barakat³, B. Angeletti¹, E. Doelsch^{4*}

(1) Aix-Marseille Univ, CNRS, IRD, Coll de France, CEREGE UM34, 13545 Aix en Provence, France.

(2) iCEINT, International Center for the Environmental Implications of NanoTechnologies, CNRS - Duke university, Europôle de l'Arbois, 13545 Aix-en-Provence, France.

(3) Aix Marseille Univ, CEA, CNRS, Laboratory of Microbial Ecology of the Rhizosphere and Extreme Environments (LEMIRE), Biosciences and biotechnology Institute of Aix-Marseille (BIAM), ECCOREV FR 3098, CEA/Cadarache, St-Paul-lez-Durance, France

(4) CIRAD, UPR Recyclage et risque, F-34398 Montpellier, France.

* Corresponding author: Emmanuel Doelsch doelsch@cirad.fr

INTRODUCTION

TiO₂ nanomaterials (NMs) rank in the three most produced NMs and second in nano-enabled products ([Vance et al., 2015](#)). Due to the structural, electronic, optical, and morphological, and surface properties, they are used in electronics, energy conversion, energy storage, surface coating (photocatalytic self-cleaning surfaces), and in cosmetics as UV absorbents ([Gottschalk et al., 2015](#); [Keller et al., 2013](#)). Based on the life cycle of TiO₂ NMs-enabled products, soil is expected to be the major environmental compartment where TiO₂ NMs will be released ([Keller et al., 2013](#)) through wastewater treatment plants and sludge spreading in agricultural soils as fertilizer ([Sun et al., 2014](#)). Another unquantified source is their use in new pesticides formulations ([Kah and Hofmann, 2014](#); [Kookana et al., 2014](#)).

Studies evaluated the concentration of TiO₂ NMs in the environment and more specifically in soils ([Gottschalk et al., 2015](#); [Gottschalk et al., 2009](#); [Meesters et al., 2016](#); [Sun et al., 2016](#); [Sun et al., 2014](#)). The predicted environmental concentrations (PEC) of TiO₂ in soil ranged from 40 mg.kg⁻¹, 18 mg.kg⁻¹, 1.3 mg.kg⁻¹ down to 0.085µg.kg⁻¹. It is noteworthy sludge treated soils report the highest PEC of TiO₂ NMs. A large panel of works were performed to study the phytoavailability of TiO₂ NMs

towards plant crops and their likely entrance in food webs. Most of these works were performed in hydroponic conditions e.g. ([Kurepa et al., 2010](#); [Larue et al., 2012a](#); [Larue et al., 2012b](#); [Raliya et al., 2015](#); [Shi et al., 2013](#)). Some of them reported that TiO₂ NMs were taken up by plants, and translocated to the shoots. However, hydroponic plant growth lacks of the presence of soil. Interactions between NMs and mineral phases, natural organic matter, and microbiota have to be taken into account when studying TiO₂ NMs phytoavailability. For instance, humic acids ([Luo et al., 2015](#)), clays ([Labille et al., 2015](#)), bacteria and polymeric substances constituting biofilm ([Chowdhury et al., 2012](#); [Lin et al., 2017](#)) are known to interact with TiO₂ NMs, to modify their surface properties, and consequently their physico-chemical behavior in soils. To highlight the impact of the soils in the phytoavailability, [Wang et al. \(2014\)](#) studied the mobility of TiO₂ NMs in column using mixtures of soil and sand (from 0 to 100% of soil). They observed a decrease in TiO₂ NMs mobility when the soil mass fraction increased.

In the current study, we aimed at evaluating the impact of soil properties on TiO₂ nanoparticles (TiO₂ NPs) phytoavailability in tall fescue (*Festuca arundinacea*), using a set of soils with contrasted properties (clay, organic and carbonate contents, cationic exchange capacity, pH, etc.). We also considered the role of TiO₂ NPs shapes using cubic, spherical, and rod-shape anatase. To study Ti soil-plant transfers, we used the RHIZOtest device [ISO-16198 \(2015\)](#), which is based on a root mat surface, put into close contact with the soil. This technique allows an easy and quick harvesting of the whole plant and the soil. Recently, the RHIZOtest was introduced as a useful tool to analyze the phytoavailability of CeO₂ NMs at concentrations close to PEC in fescue and tomato ([Layet et al., 2017](#)). Herein, we selected three concentrations i.e. 1 mg.kg⁻¹, 15 mg.kg⁻¹ in the range of PEC in soils and 150 mg.kg⁻¹, to mimic a long-term or an incidental situation.

MATERIAL AND METHODS

TiO₂ nanomaterials

Laboratory-synthesized TiO₂-rods and TiO₂-cubes. The structural, morphological and physicochemical properties are summarized in Table 1. The sol-gel synthesis of anatase rods- and cube-shaped NPs was adapted from ([Sugimoto et al., 2003](#)). TiO₂-rods are polycrystalline rod-like nanoparticles with a 200 nm length (Figure 1A). The XRD pattern gave crystallites size of 20 nm along the [001] direction and around 10 nm in the other directions. These rods are composed of the oriented aggregation of several smaller monocrystalline rods, stacked along the [001] axis. TiO₂-rods have a SSA (BET) of 120 m².g⁻¹. In suspension, their average hydrodynamic diameter is estimated about 110 ± 1 nm and their IEP around 4.5 (see SI). TiO₂-cubes are pseudo-cubic nanoparticles of 25 nm with {100} and {001} faces (Figure 1B). TiO₂-cubes have a SSA (BET) of 70 m².g⁻¹. In

suspension, their average hydrodynamic diameter is estimated about 203 ± 2 nm and an IEP of 5.6 (see SI).

Commercialized TiO₂-spheres. These NPs are produced by the third most important TiO₂ producer worldwide and destined for various applications. The structural, morphological and physicochemical properties are summarized in Table 1. TiO₂-spheres were delivered as a powder with a bulk density of 0.5 g.cm^{-3} . They were pseudo-spherical crystallite of anatase with an approximate size of 5 nm (Figure 1C). In suspension, their hydrodynamic diameter was about 400 ± 45 nm with an IEP estimated around 6.5 nm.

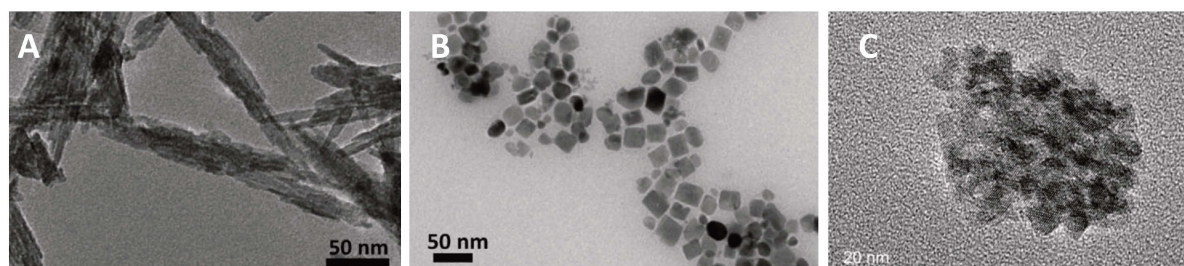


Figure 1. Transmission electron microscopy pictures of the TiO₂-rods (A), TiO₂-cubes (B), and TiO₂-spheres (C). From (Dufour et al., 2015) and (Adam et al., 2016)

Table 1. Structural, morphological, and physicochemical properties of TiO₂ NPs.

Name	Rods	Cubes	Spheres
Reference	(Dufour et al., 2015)	(Dufour et al., 2015)	(Adam et al., 2016)
Shape ^a	Rod-like	Pseudo-cubic	Pseudo-spheres
Crystalline phase ^b	100% anatase	97% anatase	100% anatase
		3% brookite	
Size (nm) ^a	10 x 200	25	5
Specific surface area (m ² .g ⁻¹)	120 ^c	70 ^c	280 ^d
Isoelectric point ^e	4.5	5.6	6.5
Hydrodynamic diameter (nm) ^f	110 ± 1	203 ± 2	400 ± 45

^a TEM (Transmission Electron Microscopy)

^b X-ray Diffraction analysis

^c SSA measured by BET (Brunauer, Emmet and Teller) method

^d SSA calculated

^e Titration method (ref. ([Dufour et al., 2015](#))) or zeta potential measurements

^f DLS (Dynamic light scattering) in water at pH 6

Soils characteristics and treatments

Four soil differing in their pH-value, organic matter and carbonate contents, cation exchange capacity (CEC) and particle size distribution were selected (Figure 2 and see SI Table S1). Clay and sandy loams were purchased from LUFA Speyer. Clay loams are classified (WRB) as vertisol coming from Hanhofen (Germany) and sandy loams as gleysol from Siebeldingen (Germany). High OM loam is a luvisol sampled in a field under permanent pasture (Cote Saint-André, France) whereas the high carbonate loam is a rendosol and was sampled in an uncultivated field for more than 10 years (Collias, France).

Soils were treated with suspensions of TiO₂-rods, TiO₂-spheres, and TiO₂-cubes (0.030, 0.45 and 4.5 g.L⁻¹) to achieve concentrations of 1, 15 and 150 mg.kg⁻¹ of soil (dry mass), respectively. The concentrations of 1 and 15 mg.kg⁻¹ were selected based on the range of predicted environmental concentrations ([Gottschalk et al., 2015](#)). The highest concentration of 150 mg.kg⁻¹ could mimic an incidental contamination.

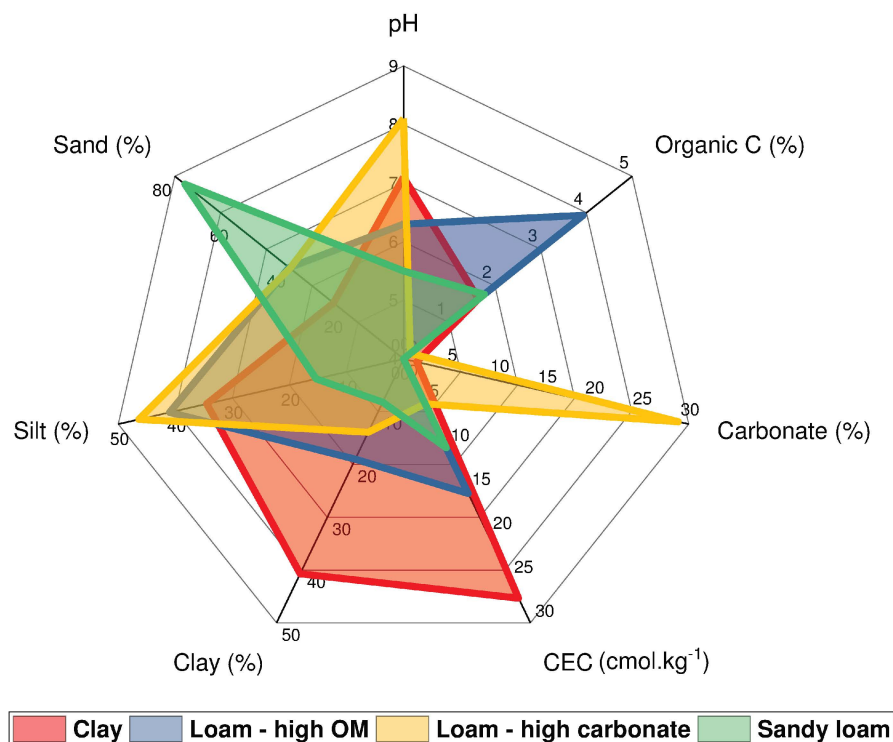


Figure 2. Characteristics of the four soils used.

RHIZOtest Experiment

The experimental procedure is detailed elsewhere [ISO-16198 \(2015\)](#). The RHIZOtest is a two-step procedure. The tall fescue seedlings (*Festuca arundinacea*, cv. Callina, R.A.G.T semences company, Rodez, France) were firstly grown (preculture period) for 14 days in hydroponics in a cylinder closed at the bottom with a 30- μ m polyamide mesh to promote the development of a dense, planar root mat. In the second step (culture period), the plants were firmly pressed down on a 6 mm-thick layer of soil for a period of eight days.

Prior to injection of suspensions on soil surface, a probe sonicator was used to disperse TiO₂ nanoparticle agglomerates ([Jiang et al., 2009](#)). Immediately preceding contact between plant and soil, 100 μ L of TiO₂ treatments were added at the soil surface. For each condition (TiO₂ treatment \times concentration \times soil type), at least four replicates were run, representing a total of 180 plant pots. The whole RHIZOtest experiment was conducted in a growth chamber with controlled climatic conditions (16 h day, 200-400 μ mol of photons.m⁻².s⁻¹, 75% relative humidity and a temperature of 25°C; 8 h night, 70% relative humidity and a temperature of 20°C).

At the end of the culture period, the whole plants were harvested and dried at 50°C to determine their biomass. Next, the plants were burned for two hours in a platinum cup at 500 °C. The ashes were mixed with a few drops of pure water and 2 mL of nitric acid (6 mol.L⁻¹), the solution was filtrated using ashless filter paper in a volumetric flask. The filter containing the residue was burned for 30 min

at 500 °C, moistened with few drops of ultra-pure water, mixed with 2 mL of concentrated hydrofluoric acid and boiled on a hot plate until evaporation. The residue was mixed with few drops of pure water and 2 mL of nitric acid (6 mol.L⁻¹), and the solution was transferred to the same volumetric flask, which was topped up to the gauge level with ultra-pure water. A set of control plants was harvested at the end of the preculture period in hydroponics to determine the pools of titanium in the plants before exposure to soil.

Ti concentrations and fluxes in plant

The total Ti concentrations were determined with an inductively coupled plasma-mass spectrometry (Thermo Scientific iCAP Q ICP-MS). For quality control, in-house reference samples (leaf of palm tree) and certified samples (reference NIM-GBW10012, LGC) were used every 20 samples and each analysis was conducted in triplicate. The measurement uncertainty was 10%. The flux (ng.m⁻².s⁻¹) of titanium taken up in the whole plant (root and shoot) during the test culture period can be calculated according to the following equation 1:

$$F = \frac{[(C_f \times m_f) - (C_p \times m_p)]}{S \times t}$$

with C_f: the Ti concentration in the plant at the end of the test culture period;

m_f: the dry biomass of plants at the end of the test culture period;

C_p: the Ti concentration in control plant pots at the end of the preculture period;

m_p: the mean dry biomass of roots of control plant pots at the end of the preculture period;

S: the surface area of the root mat in contact with soil;

t: the duration of the test culture period.

Analysis of soil solutions

After the plants were harvested, the soil of each pot was collected. A surrogate of soil solution was recovered by soil extraction (soil:water ratio=1:10) with the nutrient solution. The mixture was shaken for 45 min using a rotary shaker at 16 rpm and centrifuged (20 min at 4 000 g). Soil solution samples were split into two aliquots. One aliquot was used for pH analyses. The second aliquot was mixed with 10 µL sodium azide (final concentration 1×10⁻³ mol.L⁻¹) and used to quantify dissolved organic carbon content (TOC-L CSH, Shimadzu). All soil solutions were kept at 4 °C before analysis.

Statistics

Principal Component Analysis (PCA) was used to visualize the data set and to reduce the dimensionality by projecting each sample onto the main principal components ([Ringner, 2008](#)). PCA

was performed on 164 observations each corresponding to an individual RHIZOtest experiment. The environmental factors (levels) were soil type (clay soil, loam-high OM, loam-high carbonate, sandy loam), treatment (TiO₂-rods, TiO₂-spheres, and TiO₂-cubes), and TiO₂ concentrations (1, 15, 150 mg.kg⁻¹). The variables of interest were the Ti flux, plant biomass, pH and DOC in soil solution. As the variables were measured in different units, they were centered and scaled to unit variance. Analyses were carried out in the statistical environment R ([Team, 2011](#)) using packages *ade4* ([Thioulouse and Dray, 2007](#)) and *adegraphics* ([Dray et al., 2017](#)). Differences among groups with multiple response variables were assessed using permutations-based multivariate analysis of variance (PERMANOVA, 1000 permutations) in *Vegan* ([Oksanen et al., 2013](#)). PERMANOVA partitions the variance as does ANOVA, but can be applied even if the data distribution is non-normal.

The distribution of the investigated variables and residues were tested for normality using Shapiro-Wilk's test and for homoscedasticity using Levene's test. As the Ti flux fitted a non-normal distribution, we used a non-parametric Kruskal-Wallis' test followed with Dunn's post hoc test in R environment ([Team, 2011](#)) for comparisons of Ti flux among the treatment groups. The p-values were corrected from false discovery rate due to multiple post-hoc comparisons using the Benjamini-Hochberg (BH) method ([Benjamini and Hochberg, 1995](#)) p-values or BH-corrected Dunn's post hoc test p-values under 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

TiO₂ concentrations and soil types drive Ti phytoavailability

Principal component analysis (PCA) describes the structure of the individuals and the relationships between variables. The first three components accounted for over 90.5% of the variance, illustrating most of the information in these three dimensions.

The score plots and correlation graphs on PC1 vs PC2 and PC2 vs PC3 are represented in Figure 3. The first component PC1 showed a strong negative association between the pH and the DOC in soil solution and the observations clustered on this component according to the type of soil. The second component PC2 was dominated by the contribution of plant biomass and the third component PC3 by the Ti flux. Among the variables studied (plant biomass, pH and DOC in solution), none had any strong association with Ti flux in plants.

We used a non-parametric distance-based permutation approach (PERMANOVA) to test the effect of the environmental factors on the Ti flux. PERMANOVA analysis showed a significant clustering of Ti flux based on TiO₂ concentration ($F=805.5$; $p\text{-value}<0.001$) and soil type ($F=7.5$; $p\text{-value}<0.001$), and revealed significant interactions ($p\text{-value}<0.001$) between soil, treatment and concentration variables taken in pairs.

The shape of the TiO₂ NPs did not cluster Ti flux but could significantly impact the root biomass ($F=3.8$; $p\text{-value}<0.01$). The soil type also significantly clustered the foliar biomass ($F=6.3$; $p\text{-value}<0.001$) and the total biomass ($F=2.9$; $p\text{-value}<0.05$).

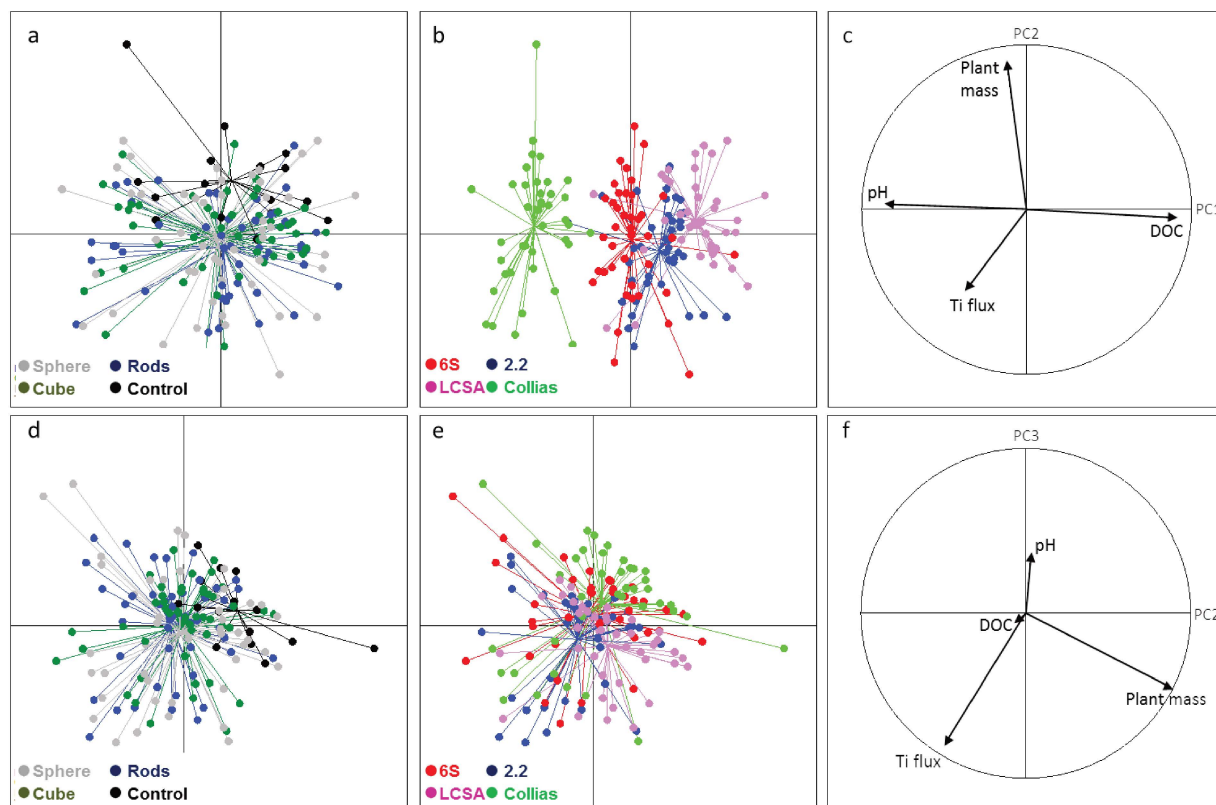


Figure 3. Principal component analysis of the dataset. The three first principal components PC1, PC2, and PC3 explained 41.4, 25.5, and 23.6% of the variability, respectively. Score plots and correlation graphs are represented according to projections on PC1 vs PC2 (a, b, c), and PC2 vs PC3 (d, e, f). Colored dots stand for TiO₂ treatments on figure 1a and 1d (grey for spheres, green for cubes, dark blue for rods and black for controls), and soil types on Fig. 1b and e (red for clay, pink for loam-high OM, dark blue for sandy loam and green for loam-high carbonate soils).

At PEC, TiO₂ NPs phytoavailability is indistinguishable from geogenic Ti

The RHIZOtest was used as a bioassay to detect differences in Ti phytoavailability between treatments within the range of TiO₂ NPs PEC in agricultural soils ([Gottschalk et al., 2015](#)). Figure 4 shows the relationship between the Ti flux as function of soil type and modalities. A modality is defined here as a TiO₂ treatment at a given exposure concentration. For the lowest concentration tested (1 mg.kg⁻¹, close to the PEC), the Ti flux induced by TiO₂-rods, TiO₂-spheres, and TiO₂-cubes did not significantly differ ($p\text{-value}>0.05$) from the controls (no Ti added).

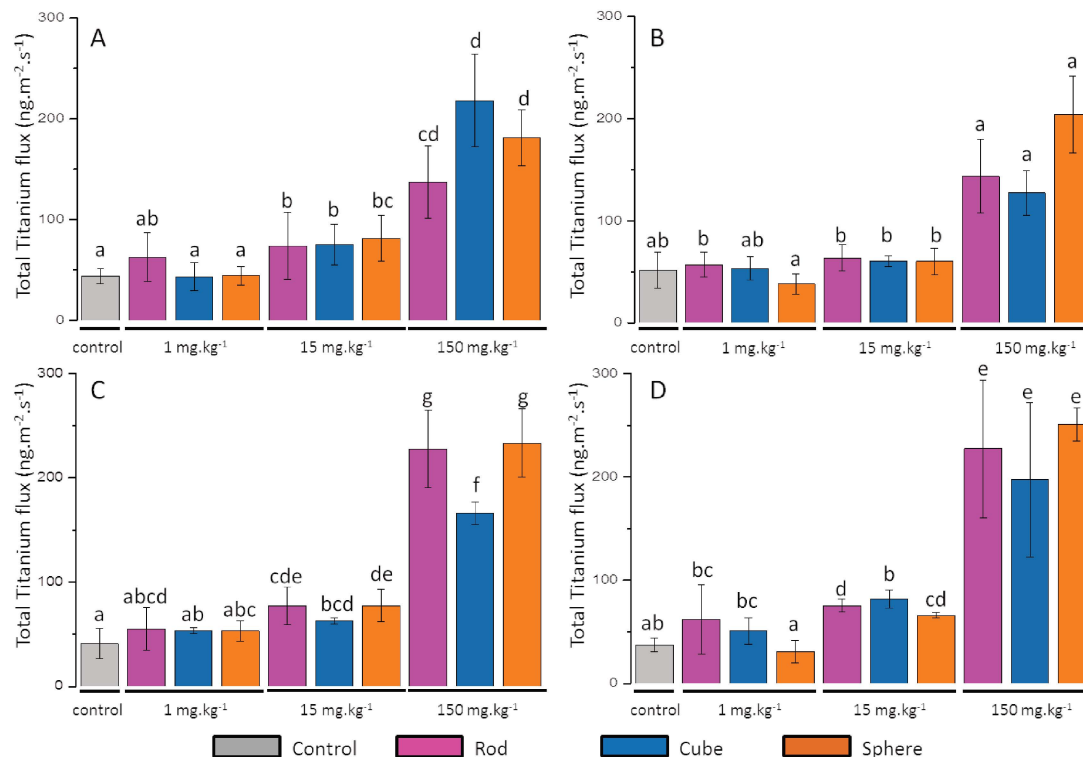


Figure 4. Total Ti flux in fescue cultivated on four soils (A: Clay soil; B: Loam-high OM; C: Sandy loam; D: Loam-high carbonate) contaminated with TiO₂-rods, TiO₂-spheres, and TiO₂-cubes. Multiple comparisons (Kruskal Wallis test) were done on each soil. Different lower cases represent significant differences between each treatment and concentration exposure on one soil.

Soil-dependent Ti phytoavailability at high TiO₂ NPs concentrations

Figure 4 also shows that Ti fluxes in fescue exposed to 15 mg.kg⁻¹ and 150 mg.kg⁻¹ were significantly higher than control groups (p-value <0.05) except on loam-high OM. This result highlights the sensitivity of the RHIZOtest as a bioassay to detect differences in phytoavailability between treatments, even for an element for which the geogenic concentration is elevated. It is noteworthy that an increase by a factor of 10 in the exposure concentration (from 15 to 150 mg.kg⁻¹) induces a total Ti flux increase of only 1.8 to 3 (Figure 4). However, we did not detect any significant effect of the shape of the TiO₂ NPs (cubes, spheres, and rods) on the total Ti flux (Figure 4).

Figure 5 shows that the soil type had an effect on phytoavailability at the highest concentration of exposure (150 mg.kg⁻¹). Soils with the highest clay contents (19% and 40.7% for respectively loam-high OM and clay soils) reported the lowest Ti flux in plant. It is likely that hetero-aggregation between clays and TiO₂ NPs was the main physico-chemical reaction responsible of such a limited Ti flux to the plant (Wang et al., 2015b; Zhou et al., 2012b). Aggregation between various clays and TiO₂ NPs were studied as a function of pH and ionic strength. Aggregation essentially occurred at pH 4 because of the positive charges of TiO₂ NPs and the negative surface charges of clays. At pH 8, TiO₂

NMs charge is negative which would enhance its stability in a mix clay-TiO₂ NPs suspension. However, the ionic strength of the porous water could screen the charges of the TiO₂ NPs and favored the interactions with clays. Moreover, at the apex of plant roots, exudation of protons and organic acids usually decreases locally the pH near to 4.5 to enable the uptake of nutrients. This suggests that even if clays may not interact with TiO₂ at the pH of the clay soil (pH 7.1) and loam-high OM soil (pH 6.3), they could locally favor TiO₂ hetero-aggregation at the vicinity of the root apex due to the plant exudation and pH decrease (Navarro et al., 2014; Zhang et al., 2017).

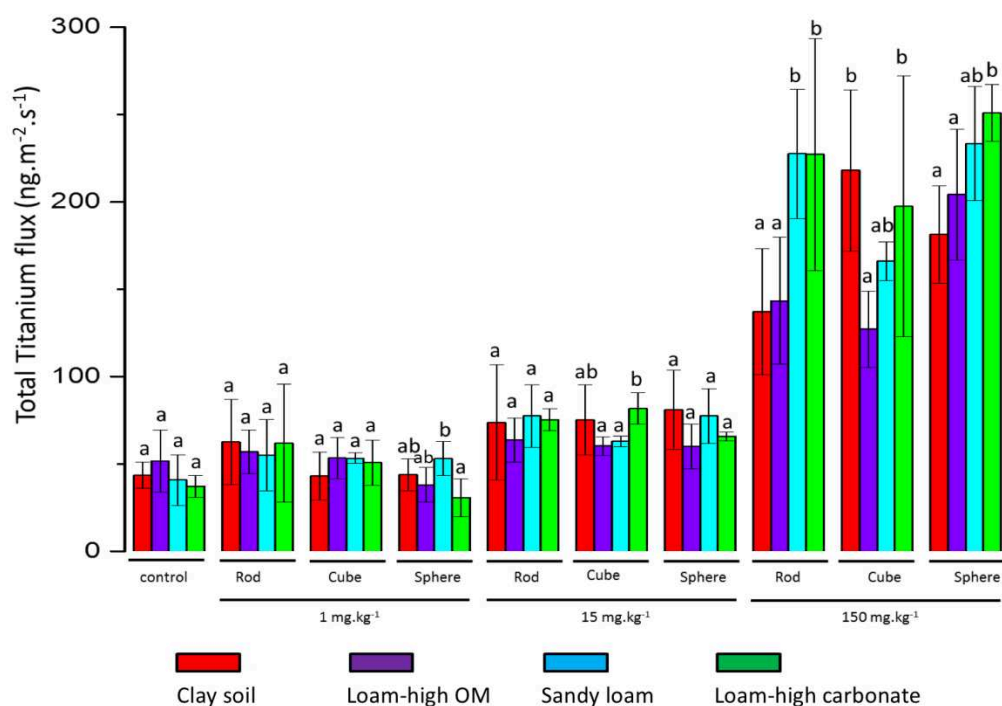


Figure 5. Total Ti flux in fescue cultivated on four soils contaminated with TiO₂-rods, TiO₂-spheres, and TiO₂-cubes at 1, 15, 150 mg.kg⁻¹. Different lower cases represent significant differences between modalities (Kruskal-Wallis test) in four soils, for each treatment and concentration exposure.

Ti translocation is regulated by TiO₂ NPs shapes and soil types

Figure 6 and 7 show the Ti concentration in shoots after exposure to TiO₂ NPs in the four soils. As a global trend, the concentrations in shoots were soil-dependent but also TiO₂ NPs shape-dependent. Higher concentrations than controls were observed with loam-high OM and loam-high carbonate. In loam-high OM, higher concentrations in shoots were observed for TiO₂-cubes and TiO₂-spheres whatever the initial concentrations in soil. In loam-high carbonate, concentrations in shoots were significantly higher than control groups for TiO₂-cubes at 15 mg.kg⁻¹ and for the TiO₂-rods at the highest concentrations (15 and 150 mg.kg⁻¹).

In the literature, translocation is not systematic for all plants. Jacob et al. (2013) reported Ti translocation only with *Rumex crispus* but not with *Phaseolus vulgaris* nor *Triticum aestivum*.

Translocation of TiO₂ NPs involves crossing the endodermis, bordered by the Casparian trip, which limits transfer to plant vessel from the apoplast. The plasmodesma diameter would limit particle larger than 3-4 nm but [Wang et al. \(2011b\)](#) reported that anatase TiO₂ NPs can disrupt microtubules, which enlarge plasmodesma diameter. [Larue et al. \(2012a\)](#) reported size-dependent uptakes of TiO₂ (Anatase) NPs by wheat. The Ti concentration in root decreased when the NPs size increased. They also observed Ti clusters in wheat shoots (in leaf parenchyma and nerves) with TiO₂ NMs primary size of 14 and 25 nm for Anatase, and 22 nm for Rutile (but not for Rutile with a primary size of 35 nm) ([Larue et al. \(2012a\)](#)). Absorption of TiO₂ with larger size than cell wall pores was consequently possible. Several NPs, including TiO₂ are known to induce the production of reactive oxygen species (ROS) in the dark or illuminated by UV, reacting with dissolved oxygen and water ([Fenoglio et al., 2009](#); [Guo et al., 2011](#)). ROS are able to interact with cell wall components and enhance endocytosis due to the decrease of mechanical strains on cells wall ([Kim et al. \(2014\)](#)). This cell wall degradation is a possible pathway of uptake of TiO₂ NPs with larger size than the initial pore size of cell walls.

[Dufour et al. \(2015\)](#) observed that TiO₂-cubes has a stronger reactivity in term of adsorption of molecules on their surface. The changes in the NPs morphology directly impact on the nature, number and reactivity of exposed surface groups, which means here the acidic properties in terms of Brönsted or Lewis acidity ([Dufour et al., 2015](#)). In the near future, it would be interested to compare the photocatalytic activities of the TiO₂-cubes, TiO₂-rods, and TiO₂-spheres (with their larger specific surface area) in physico-chemical conditions closer to soil solutions (i.e. ionic strength, pH, organic matter). This could help us to better understand the shape-dependent Ti translocation in the shoots in the four soils studies.

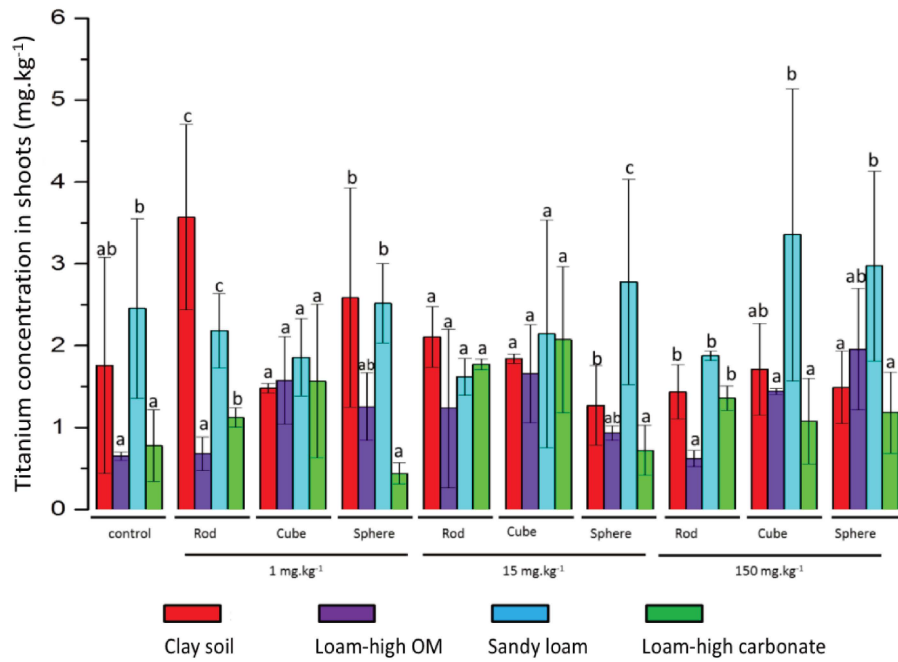


Figure 6. Titanium concentration in fescue shoots cultivated on four soils. Concentrations are reported for controls each concentrations exposure (1, 15, 150 mg.kg⁻¹). Different lower cases represent significant differences between modalities (Kruskal-Wallis test) in four soils, for each treatment and concentration exposure.

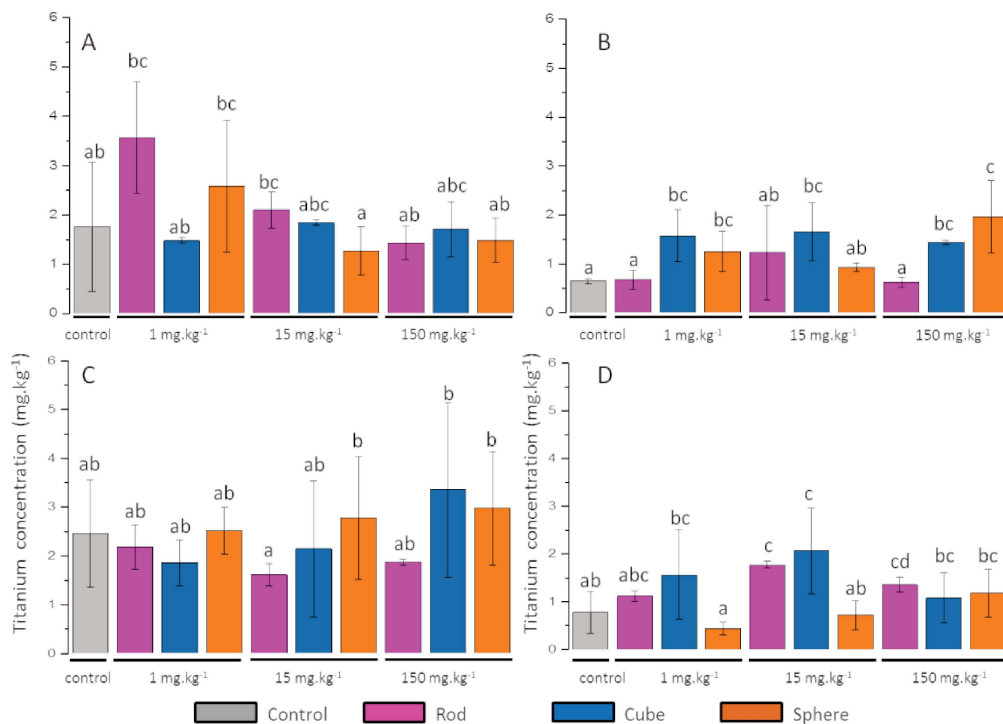


Figure 7. Titanium concentration in fescue shoots cultivated on four soils (A: Clay soil; B: Loam-high OM; C: Sandy loam; D: Loam-high carbonate). Multiple comparisons (Kruskal Wallis test) were done on each soil. Different lower cases represent significant differences between each treatment and concentration exposure on one soil.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the French Environment and Energy Management Agency (ADEME) and Labex Serenade (funded by the «Investissements d’Avenir» French Government program of the French National Research Agency (ANR-11-LABX-0064) through the A*MIDEX project (ANR-11-IDEX-0001-02)) for Clément Layet’s PhD grant. The authors acknowledge INSU (CNRS) for funding the study via the EC2CO-ECODYN call. The authors acknowledge the CNRS funding for the GDRi iCEINT, and the OSU-Institut Pythéas. We also thank X. Lacan and C. Villefranque from RAGT semences who kindly provided the tall fescue seeds and the European Synchrotron Radiation Facility for access to the synchrotron radiation facilities.

REFERENCES

- Adam, V., Loyaux-Lawnczak, S., Labille, J., Galindo, C., del Nero, M., Gangloff, S., Weber, T., and Quaranta, G. (2016). Aggregation behaviour of TiO₂ nanoparticles in natural river water. *Journal of Nanoparticle Research* **18**, 13.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. Roy. Statist. Soc. Ser.* **57**, 289–300.
- Chowdhury, I., Cwiertny, D. M., and Walker, S. L. (2012). Combined Factors Influencing the Aggregation and Deposition of nano-TiO₂ in the Presence of Humic Acid and Bacteria. *Environmental Science & Technology* **46**, 6968-6976.
- Dray, S., Dufour, A.-B., and Thioulouse, J. (2017). Analysis of Ecological Data : Exploratory and Euclidean Methods in Environmental Sciences. *R package Version* **1.7-6**.
- Dufour, F., Pigeot-Remy, S., Durupthy, O., Cassaignon, S., Ruaux, V., Torelli, S., Mariey, L., Maugé, F., and Chanéac, C. (2015). Morphological control of TiO₂ anatase nanoparticles: What is the good surface property to obtain efficient photocatalysts? *Applied Catalysis B: Environmental* **174**, 350-360.
- Fenoglio, I., Greco, G., Livraghi, S., and Fubini, B. (2009). Non-UV-Induced Radical Reactions at the Surface of TiO₂ Nanoparticles That May Trigger Toxic Responses. *Chemistry – A European Journal* **15**, 4614-4621.
- Gottschalk, F., Lassen, C., Kjoelholm, J., Christensen, F., and Nowack, B. (2015a). Modeling Flows and Concentrations of Nine Engineered Nanomaterials in the Danish Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **12**, 5581-5602.
- Gottschalk, F., Lassen, C., Kjoelholm, J., Christensen, F., and Nowack, B. (2015b). Modeling Flows and Concentrations of Nine Engineered Nanomaterials in the Danish Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **12**, 5581-5602.
- Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R. W., and Nowack, B. (2009). Modeled Environmental Concentrations of Engineered Nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for Different Regions. *Environmental Science & Technology* **43**, 9216-9222.
- Guo, Y., Cheng, C., Wang, J., Wang, Z., Jin, X., Li, K., Kang, P., and Gao, J. (2011). Detection of reactive oxygen species (ROS) generated by TiO₂(R), TiO₂(R/A) and TiO₂(A) under ultrasonic and solar light irradiation and application in degradation of organic dyes. *Journal of Hazardous Materials* **192**, 786-793.
- ISO-16198 (2015). Soil quality - Plant-based test to assess the environmental bioavailability of trace elements to plants.
- Jacob, D. L., Borchardt, J. D., Navaratnam, L., Otte, M. L., and Bezbaruah, A. N. (2013). Uptake and Translocation of Ti from Nanoparticles in Crops and Wetland Plants. *International Journal of Phytoremediation* **15**, 142-153.

- Jiang, J., Oberdörster, G., and Biswas, P. (2009). Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research* **11**, 77-89.
- Kah, M., and Hofmann, T. (2014). Nanopesticide research: Current trends and future priorities. *Environment International* **63**, 224-235.
- Keller, A. A., McFerran, S., Lazareva, A., and Suh, S. (2013). Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *Journal of Nanoparticle Research* **15**.
- Kim, J. H., Lee, Y., Kim, E. J., Gu, S., Sohn, E. J., Seo, Y. S., An, H. J., and Chang, Y. S. (2014). Exposure of Iron Nanoparticles to *Arabidopsis thaliana* Enhances Root Elongation by Triggering Cell Wall Loosening. *Environmental Science & Technology* **48**, 3477-3485.
- Kookana, R. S., Boxall, A. B. A., Reeves, P. T., Ashauer, R., Beulke, S., Chaudhry, Q., Cornelis, G., Fernandes, T. F., Gan, J., Kah, M., Lynch, I., Ranville, J., Sinclair, C., Spurgeon, D., Tiede, K., and Van den Brink, P. J. (2014). Nanopesticides: Guiding Principles for Regulatory Evaluation of Environmental Risks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**, 4227-4240.
- Kurepa, J., Paunesku, T., Vogt, S., Arora, H., Rabatic, B. M., Lu, J. J., Wanzer, M. B., Woloschak, G. E., and Smalle, J. A. (2010). Uptake and Distribution of Ultrasmall Anatase TiO₂ Alizarin Red S Nanoconjugates in *Arabidopsis thaliana*. *Nano Letters* **10**, 2296-2302.
- Labille, J., Harns, C., Bottero, J.-Y., and Brant, J. (2015). Heteroaggregation of titanium dioxide nanoparticles with natural clay colloids. *Environmental Science & Technology* **49**, 6608-6616.
- Larue, C., Laurette, J., Herlin-Boime, N., Khodja, H., Fayard, B., Flank, A. M., Brisset, F., and Carriere, M. (2012a). Accumulation, translocation and impact of TiO₂ nanoparticles in wheat (*Triticum aestivum* spp.): Influence of diameter and crystal phase. *Science of the Total Environment* **431**, 197-208.
- Larue, C., Veronesi, G., Flank, A. M., Surble, S., Herlin-Boime, N., and Carriere, M. (2012b). Comparative Uptake and Impact of TiO₂ Nanoparticles in Wheat and Rapeseed. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues* **75**, 722-734.
- Layet, C., Auffan, M., Santaella, C., Chevassus-Rosset, C., Montes, M., Ortet, P., Barakat, M., Collin, B., Legros, S., Bravin, M. N., Angeletti, B., Kieffer, I., Proux, O., Hazemann, J.-L., and Doelsch, E. (2017). Evidence that Soil Properties and Organic Coating Drive the Phytoavailability of Cerium Oxide Nanoparticles. *Environmental Science & Technology* **51**, 9756-9764.
- Lin, D., Story, S. D., Walker, S. L., Huang, Q., Liang, W., and Cai, P. (2017). Role of pH and ionic strength in the aggregation of TiO₂ nanoparticles in the presence of extracellular polymeric substances from *Bacillus subtilis*. *Environmental Pollution* **228**, 35-42.
- Luo, M., Huang, Y., Zhu, M., Tang, Y.-n., Ren, T., Ren, J., Wang, H., and Li, F. (2015). Properties of different natural organic matter influence the adsorption and aggregation behavior of TiO₂ nanoparticles. *Journal of Saudi Chemical Society*.
- Meesters, J. A. J., Quik, J. T. K., Koelmans, A. A., Hendriks, A. J., and van de Meent, D. (2016). Multimedia environmental fate and speciation of engineered nanoparticles: a probabilistic modeling approach. *Environmental Science-Nano* **3**, 715-727.
- Navarro, D. A., Kirby, J. K., McLaughlin, M. J., Waddington, L., and Kookana, R. S. (2014). Remobilisation of silver and silver sulphide nanoparticles in soils. *Environmental Pollution* **193**, 102-110.
- Oksanen, J. F., Blanchet, G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Henry, M. H. S., Szoecs, E., and Wagner, H. (2013). vegan: Community Ecology Package. *R package Version* **2.4-3**.
- Raliya, R., Nair, R., Chavalmane, S., Wang, W. N., and Biswas, P. (2015). Mechanistic evaluation of translocation and physiological impact of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles on the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plant. *Metallomics* **7**, 1584-1594.
- Ringner, M. (2008). What is principal component analysis? *Nat Biotech* **26**, 303-304.
- Shi, H. B., Magaye, R., Castranova, V., and Zhao, J. S. (2013). Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and Fibre Toxicology* **10**.

- Sugimoto, T., Zhou, X., and Muramatsu, A. (2003). Synthesis of uniform anatase TiO₂ nanoparticles by gel-sol method: 4. Shape control. *Journal of Colloid and Interface Science* **259**, 53-61.
- Sun, T. Y., Bornhoft, N. A., Hungerbuhler, K., and Nowack, B. (2016). Dynamic Probabilistic Modeling of Environmental Emissions of Engineered Nanomaterials. *Environmental Science & Technology* **50**, 4701-4711.
- Sun, T. Y., Gottschalk, F., Hungerbuhler, K., and Nowack, B. (2014). Comprehensive probabilistic modelling of environmental emissions of engineered nanomaterials. *Environmental Pollution* **185**, 69-76.
- Team, R. D. C. (2011). R: A Language and Environment for Statistical Computing. (t. R. F. f. S. Computing, ed.), Vienna, Austria.
- Thioulouse, J., and Dray, S. (2007). Interactive multivariate data analysis in R with the ade4 and ade4TkGUI packages. *Journal of Statistical Software* **22**, 1-14.
- Vance, M. E., Kuiken, T., Vejerano, E. P., McGinnis, S. P., Hochella, M. F., Rejeski, D., and Hull, M. S. (2015). Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology* **6**, 1769-1780.
- Wang, D., Su, C., Zhang, W., Hao, X., Cang, L., Wang, Y., and Zhou, D. (2014). Laboratory assessment of the mobility of water-dispersed engineered nanoparticles in a red soil (Ultisol). *Journal of Hydrology* **519**, 1677-1687.
- Wang, H., Dong, Y.-n., Zhu, M., Li, X., Keller, A. A., Wang, T., and Li, F. (2015). Heteroaggregation of engineered nanoparticles and kaolin clays in aqueous environments. *Water Research* **80**, 130-138.
- Wang, S. H., Kurepa, J., and Smalle, J. A. (2011). Ultra-small TiO₂ nanoparticles disrupt microtubular networks in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell and Environment* **34**, 811-820.
- Zhang, W., Musante, C., White, J. C., Schwab, P., Wang, Q., Ebbs, S. D., and Ma, X. (2017). Bioavailability of cerium oxide nanoparticles to *Raphanus sativus* L. in two soils. *Plant Physiology and Biochemistry* **110**, 185-193.
- Zhou, D. X., Abdel-Fattah, A. I., and Keller, A. A. (2012). Clay Particles Destabilize Engineered Nanoparticles in Aqueous Environments. *Environmental Science & Technology* **46**, 7520-7526.

Chapitre IV : Etude de la phytodisponibilité des nanomatériaux en fonction des propriétés des sols et des nanomatériaux. Troisième cas d'étude : l'argent (Ag^0).

IV.1 Résumé de l'étude

Les NMs d'argent ne constituent pas la quantité de NMs la plus importante produite dans l'industrie. En revanche, il s'agit des NMs incorporés dans le plus grand nombre de produits ([Keller et al., 2013](#); [Vance et al., 2015](#)). Les NMs d' Ag^0 sont généralement utilisés pour leurs propriétés antimicrobiennes, et incorporés dans divers produits, tels que les textiles, les cosmétiques, et les produits phytosanitaires ([Kah and Hofmann, 2014](#); [Keller et al., 2013](#)).

Le cycle de vie de ces produits implique un rejet des NMs d'Ag dans le compartiment sol. Les modélisations ont estimé une concentration en Ag issu des NMs dans les sols comprise entre 6 et 1390 ng.kg^{-1} ([Gottschalk et al., 2015](#); [Sun et al., 2016](#); [Sun et al., 2014](#)). Les propriétés biocides des NMs d'Ag et leurs accumulations dans l'environnement nécessitent de comprendre leurs interactions avec le vivant.

Plusieurs travaux ont étudié la phytodisponibilité des NMs d'Ag, mais en cultivant principalement les plantes en hydroponie. Ce mode de culture ne permet pas de prendre en compte les interactions et les réactions chimiques possibles entre les NMs d'Ag et les différentes composantes du sol. Ces NMs sont reconnus pour avoir une instabilité physico-chimique dans ces milieux complexes.

L'objectif de cette nouvelle expérimentation en RHIZOtest était de déterminer une nouvelle fois l'impact des propriétés des sols et des NMs d'Ag sur la phytodisponibilité des NMs. Des NMs de Ag enrobés de SiO_2 , et de PVP (polyvinylpyrrolidone) ont été exposés à des plantes de fétuque élevée.

Cette phytodisponibilité des NMs a été comparée à la phytodisponibilité de Ag issu de AgNO_3 . En accord avec les estimations des concentrations des NMs dans les sols ([Sun et al., 2016](#); [Sun et al., 2014](#)), nous avons utilisé une concentration d'exposition proche : $0.0015 \text{ mg.kg}^{-1}$, et une concentration mille fois plus forte : 0.15 mg.kg^{-1} de sol. Les NMs de Ag enrobés de SiO_2 ont une taille de $53.5 \pm 4.5 \text{ nm}$ et ceux enrobés de PVP ont une taille de $49.9 \pm 4.6 \text{ nm}$. Le dispositif expérimental n'a pas été modifié par rapport à l'étude des NMs de TiO_2 . Nous avons conservé la même variété de fétuque (*Festuca arundinacea*), cultivée sur les quatre mêmes sols que précédemment.

Nous avons mis en évidence que :

- Le flux d'argent dans les plantes exposées à la concentration en argent la plus faible ($0.0015 \text{ mg.kg}^{-1}$) n'est pas significativement différent des échantillons témoins. En revanche, pour une concentration d'exposition mille fois plus forte, le flux d'argent dans la plante est significativement supérieur au flux observé dans les échantillons témoins. La concentration en

argent dans les tiges est supérieure aux échantillons témoins lorsque les plantes sont exposées à une concentration de $0,15 \text{ mg.kg}^{-1}$.

- Il n'y a pas de différence de phytodisponibilité entre les traitements AgNO_3 et les traitements Ag NMs.
- Pour chaque sol le flux d'argent est corrélé à la concentration en argent dans la solution du sol.
- Un taux d'argile croissant induit un flux d'argent décroissant. L'interaction entre l'argile et Ag semble possible malgré un pH élevé dans les sols. Ceci s'explique par la baisse du pH à proximité des racines, ce qui rend la rétention de l'argent par les argiles possibles.

L'utilisation du RHIZOtest nous a permis de mettre en évidence un flux de Ag significativement supérieur aux flux témoins à partir de la concentration d'exposition de 0.15 mg.kg^{-1} de sol. Notre expérience a mis en évidence une phytodisponibilité des NMs de Ag équivalente de l'argent dissous dans les sols, et a également mis en évidence l'impact des propriétés des sols favorisant la rétention des NMs. Ces travaux sont décrits dans la [partie IV.2IV.2 Phytoavailability of silver at predicted environmental concentration: the nanoparticulate or ionic form does not matter.](#), dans un article intitulé « Phytoavailability of silver at predicted environmental concentration: the nanoparticulate or ionic form does not matter » et feront l'objet d'une prochaine publication. La rubrique « Supporting Information » de ces travaux est présentée dans l'[Annexe IV](#).

IV.2 Phytoavailability of silver at predicted environmental concentration: the nanoparticulate or ionic form does not matter.

Phytoavailability of silver at predicted environmental concentration: the nanoparticulate or ionic form does not matter

C. Layet^{1,2}, C. Santaella^{2,3}, M. Auffan^{1,2}, C. Chevassus-Rosset⁴, M. Montes⁴, P. Ortet³, M. Barakat³, B. Angeletti¹, E. Doelsch^{4*}

(1) Aix-Marseille Univ, CNRS, IRD, Coll de France, CEREGE UM34, 13545 Aix en Provence, France.

(2) iCEINT, International Center for the Environmental Implications of NanoTechnologies, CNRS - Duke university, Europôle de l'Arbois, 13545 Aix-en-Provence, France.

(3) Aix Marseille Univ, CEA, CNRS, Laboratory of Microbial Ecology of the Rhizosphere and Extreme Environments (LEMIRE), Biosciences and biotechnology Institute of Aix-Marseille (BIAM), ECCOREV FR 3098, CEA/Cadarache, St-Paul-lez-Durance, France

(4) CIRAD, UPR Recyclage et risque, F-34398 Montpellier, France.

* Corresponding author: Emmanuel Doelsch doelsch@cirad.fr

INTRODUCTION

Silver has inhibitory and antimicrobial properties known from time immemorial. Silver nanomaterials (Ag NMs) have entered our daily lives these past few years ([Vance et al., 2015](#)) due to their antimicrobial properties ([Pulit-Prociak and Banach, 2016](#)). Their success in various application domains as human health, surface coatings, food packaging, textiles, etc. are due to the effective silver concentrations required for antimicrobial properties that are lower at the nanoscale as compared to bulk materials and in some cases to ionic Ag ([Lok et al., 2006](#)).

Based on the life-cycle of Ag NMs-enabled products, the main release pattern of Ag NMs into the environment is through wastewater treatment plants and sludge spreading in agricultural soils as fertilizer ([Gottschalk et al., 2015](#)). Others unquantified sources of Ag NMs are their use as pesticides for plant pathogens and pest insects ([Kah and Hofmann, 2014](#)), and their deposition from incineration fumes ([Meier et al., 2016](#)). The predicted environmental concentration (PEC) of Ag NMs in soil are

estimated within a range of 6-21 ng.kg⁻¹ in agricultural soils and 50-530 ng.kg⁻¹ in sludge treated soils in Denmark ([Gottschalk et al., 2015](#)). Using a dynamic probabilistic modeling, ([Sun et al., 2014](#)) estimated the PEC of Ag NMs in the EU by 2020 in the 30-80 ng.kg⁻¹ range for natural and urban soils and 1290-1390 ng.kg⁻¹ in sludge treated soils. In soils, porous waters, sludge, etc. Ag NMs are known to be physico-chemical unstable. They will quickly undergo physico-chemical transformations (oxidation, sulfidation, dissolution, adsorption/complexation with natural colloids) altering their properties, mobility, fate and interactions with living organisms ([Levard et al., 2012](#)).

Because in most of the release scenarios, Ag NMs are expected to reach plant crops, several studies focused on the phytotoxicity and phytoavailability of Ag NMs. Most of them were performed in hydroponics. Ag NMs were found to alter seed germination, plant biomass, plant physiology, and generated oxidative stress. The non-exhaustive list of factors governing Ag NMs phytotoxicity included NM sizes, shapes, coatings, plant genotypes, and but also experimental methods ([Cox et al., 2016](#)). Plant roots were considered as the main route of Ag NMs entry in plants with translocation to the shoots and leaves ([Ma et al., 2010](#); [Wang et al., 2013a](#)). [Stegemeier et al. \(2015\)](#) studied the uptake and distribution of silver in alfalfa (*Medicago sativa*) exposed to pristine Ag NMs, sulfidized Ag₂S NMs and ionic Ag at 3 mg.L⁻¹ in hydroponics. Despite large differences in release of Ag⁺ ions from the particles, Ag NMs, Ag₂S NMs, and Ag⁺ showed similar quantitative patterns of association to plant roots and similarly limited (<1%) translocation of Ag to shoots. However, the local distribution of silver on plant roots was Ag speciation-dependent. Exposing wheat plants to Ag NMs, Ag₂S NMs and ionic Ag (3 mg.L⁻¹) in hydroponics, [Pradas del Real et al. \(2017\)](#) showed that various chemical transformations occurred on plant roots, leading to a dynamic exposure of the plant to multiple forms of silver.

However, hydroponic plant growth lacks of the presence of soil. Interactions between NMs and mineral phases, natural organic matter, and microbiota ([Basta et al., 2005](#)) have to be taken into account when studying Ag phytoavailability and phytotoxicity ([Dimkpa et al., 2013](#); [Lee et al., 2012](#)) exposed wheat to Ag NMs in a sand matrix (0.5-2.5 mg.kg⁻¹) and observed a dose-dependent reduction of growth. [Pradas del Real et al. \(2016\)](#) spread Ag NMs amended sludge in soil (18 and 400 mg.kg⁻¹) and detected Ag in the rhizosphere of wheat and rape, as nanosized Ag₂S, Ag-S species and mixed metallic sulfides with Zn and Cu. Following such exposure, Ag was undetectable in the soil pore water and poorly accumulated in plant shoots. [Doolette et al. \(2015\)](#) studied the bioavailability of Ag to lettuce using a sandy soil amended with biosolids containing Ag₂S NMs and showed limited accumulation in shoots. Moreover, Ag₂S NMs that were applied directly to a sandy soil at 1 mg.kg⁻¹ were less bioavailable than Ag₂S NMs borne biosolids. In an outdoor lysimeter study, [Schlich et al. \(2017\)](#) exposed canola and wheat to Ag NMs (1.7 and 8.0 mg.kg⁻¹) via sewage sludge into a loamy-sand soil. In spite of a low remobilization of Ag from the soil to the percolate water, Ag uptake by

roots shows that the chemical conditions in the rhizosphere induce Ag remobilization from the incorporated sewage sludge.

Several studies have deciphered the interaction between soil properties and Ag NMs e.g. ([Benoit et al., 2013](#); [Cornelis et al., 2013](#)). Although, Ag NMs mobility is regulated by edaphic properties (clay, pH, organic matter, CEC, etc.), only few studies have addressed the complex interplay of soil in silver phytoavailability at PEC. In the current study, we aimed at evaluating the impact of soil properties on Ag phytoavailability in tall fescue (*Festuca arundinacea*), using a set of soils with contrasted properties (clay, organic and carbonate contents, cationic exchange capacity, pH, etc.). We also considered the role of silver forms using nanoparticulate Ag with inorganic (SiO_2) and organic (polyvinylpyrrolidone, PVP) coatings, and dissolved Ag (AgNO_3) as silver sources. To study Ag soil-plant transfers, we used the RHIZOtest device [ISO-16198 \(2015\)](#), which is based on a root mat surface, put into close contact with the soil. This technique allows an easy and quick harvesting of the whole plant and the soil. Recently, the RHIZOtest was introduced as a useful tool to analyze the phytoavailability of CeO_2 NMs at concentrations close to PEC in fescue and tomato ([Dimkpa et al., 2013](#); [Lee et al., 2012](#)). Herein, we selected two concentrations lower than the ones already published in studies dealing with the phytoavailability of Ag NMs in soils i.e. close to Ag PEC in soils ($0.0015 \text{ mg.kg}^{-1}$) and 100 times higher than PEC (0.15 mg.kg^{-1}).

MATERIALS AND METHODS

Ag nanoparticles and dissolved Ag

Two Ag nanoparticles with similar size (TEM core diameter $\sim 50 \text{ nm}$), shape (spherical) but different coating (PVP and SiO_2) were obtained from Nanocomposix (San Diego, CA) under the trade name '50 nm PVP NanoxactTM Silver' and '50 nm silica coated NanoxactTM Silver'. Dissolved silver was obtained from AgNO_3 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI) dissolved in Milli-Q water. In the commercialized stock suspensions, SiO_2 -AgNPs were suspended in isopropyl alcohol at $1000 \text{ mg Ag.L}^{-1}$ and PVP-AgNPs in milli-Q water at 20 mg Ag.L^{-1} . These stock suspensions were diluted in milli-Q water (4.5 mg Ag.L^{-1} and 45 mg Ag.L^{-1}) before soil contamination and characterized by transmission electron microscopy (JEOL JEM 2011), X-ray absorption spectroscopy (at the Ag K-edge on the BM30b FAME beamline, ESRF, Grenoble, France), dynamic light scattering (nanoZS, Malvern, UK), and zeta potential measurements (Zetasizer, Malvern, UK).

After dilution in Milli-Q water, these SiO_2 - and PVP-AgNPs nanoparticles were spherical crystallites of metallic silver (see SI Figure S1), with a bimodal TEM size distribution with two populations centered on $\sim 50 \text{ nm}$ and $\sim 5 \text{ nm}$ (Figure 1). While the population at 50 nm matched with the size provided by the supplier, the population at $\sim 5 \text{ nm}$ is likely attributed to dissolution/reprecipitation of dissolved silver due to changes in chemical equilibrium over dilution. We measured that respectively 2% and 6.5 % of the total silver were under ionic form ($<3 \text{ KDa}$) in the diluted PVP-AgNPs and SiO_2 -

AgNPs suspensions. TEM pictures also highlighted that the SiO₂ coating had a heterogeneous thickness at around the SiO₂-AgNPs (between 10 to 30 nm). The zeta potentials of the PVP-AgNPs were negative (-11 ± 2 mV in Milli-Q water) between pH 2 and 6 due to the negatively-charged PVP coating ([Ahlberg et al., 2014](#)) (see SI Figure S2). However, for the SiO₂-AgNPs a positive/negative inversion of the zeta potential occurred around pH 4, attributed to the SiO₂ coating ([Kosmulski, 2003](#)) (see SI Figure S2).

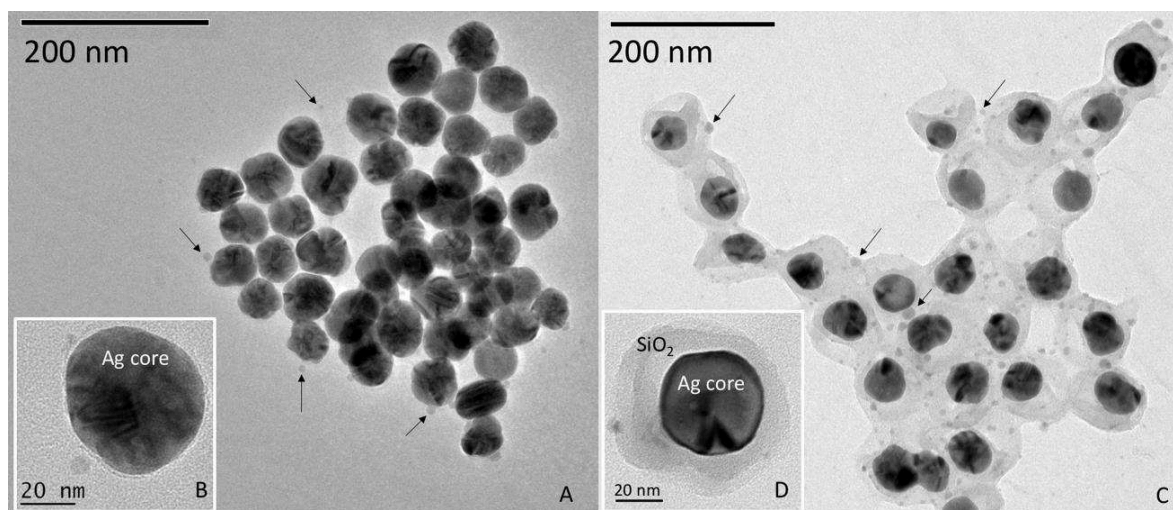


Figure 1. Transmission electron microscopy of the PVP-AgNPs (A, B) and SiO₂-AgNPs (C, D) diluted in Milli-Q water. The arrows indicate the presence of small nanoparticles attributed to the dissolution/reprecipitation of small nanoparticles over dilution.

Soils characteristic and treatments

Four soil differing in their pH-value, organic matter and carbonate contents, cation exchange capacity (CEC) and particle size distribution were selected (Figure 2 and see SI Table S1). Clay and sandy loams were purchased from LUFA Speyer. Clay loams are classified (WRB) as vertisol coming from Hanhofen (Germany) and sandy loams as gleysol from Siebeldingen (Germany). High OM loam is a luvisol sampled in a field under permanent pasture (Cote Saint-André, France) whereas the high carbonate loam is a rendosol and was sampled in an uncultivated field for more than 10 years (Collias, France).

Soils were treated with SiO₂-AgNPs suspension and dissolved silver solution with 0.0015 and 0.15 mg of Ag per kg of soil (dry mass). The lowest concentration was selected based on the range of PEC estimated by [Gottschalk et al. \(2015\)](#).

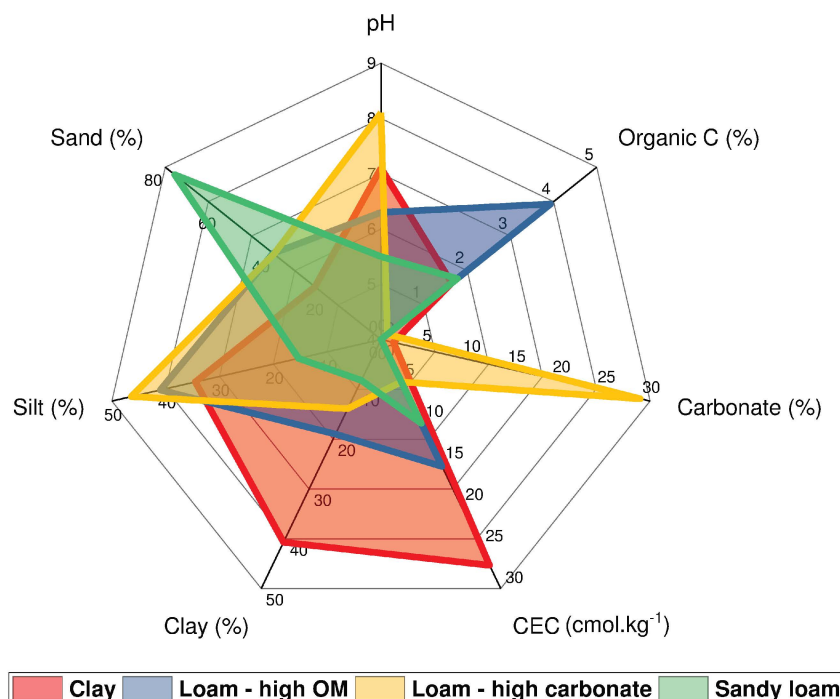


Figure 2. Characteristics of the four soils used.

RHIZOtest experiment

The experimental procedure is detailed elsewhere [ISO-16198 \(2015\)](#). The RHIZOtest is a two-step procedure. The plant seedlings were firstly grown (preculture period) for 14 days in hydroponics in a cylinder closed at the bottom with a 30- μm polyamide mesh to promote the development of a dense, planar root mat. In the second step (culture period), the plants were firmly pressed down on a 6 mm-thick layer of soil for a period of eight days. Immediately preceding contact between plant and soil, 300 μL of silver (as nanoparticulate or dissolved forms) were added at the soil surface. For each condition (silver treatment \times silver concentration \times soil type), five replicates were performed, representing a total of 180 plant pots. The whole RHIZOtest experiment was conducted in a growth chamber with controlled climatic conditions (16 h day, 200-400 μmol of photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 75% relative humidity and a temperature of 25°C; 8 h night, 70% relative humidity and a temperature of 20°C).

At the end of the culture period, the whole plants were harvested and dried at 50°C to determine their biomass. Next, the plants were burned for two hours in a platinum cup at 500 °C. The ashes were mixed with a few drops of pure water and 2 mL of nitric acid (6 mol.L⁻¹), the solution was filtrated using ashless filter paper in a volumetric flask. The filter containing the residue was burned for 30 min at 500 °C, moistened with few drops of ultra-pure water, mixed with 2 mL of concentrated hydrofluoric acid and boiled on a hot plate until evaporation. The residue was mixed with few drops of pure water and 2 mL of nitric acid (6 mol.L⁻¹), and the solution was transferred to the same volumetric flask, which was topped up to the gauge level with ultra-pure water. A set of control plants was

harvested at the end of the preculture period in hydroponics to determine the pools of silver in the plants before exposure to soil.

Ag concentrations and fluxes in plants

The total silver concentrations were determined with an inductively coupled plasma-mass spectrometry (Thermo Scientific iCAP Q ICP-MS). For quality control, in-house reference samples and certified samples were used every 20 samples and each analysis was conducted in triplicate. The measurement uncertainty was 10%. The flux ($\text{ng.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) of silver taken up in whole plants (roots and shoots) during the test culture period can be calculated according to the following equation 1:

$$F = \frac{[(C_f \times m_f) - (C_p \times m_p)]}{S \times t}$$

with C_f : the silver concentration in the plant at the end of the test culture period;

m_f : the dry biomass of plants at the end of the test culture period;

C_p : the silver concentration in control plant pots at the end of the preculture period;

m_p : the mean dry biomass of roots of control plant pots at the end of the preculture period;

S : the surface area of the root mat in contact with soil;

t : the duration of the test culture period.

Analysis of the soil solutions

At plant harvest, the soil of each plant pot was collected. A surrogate of soil solution was recovered by a soil extraction (soil:water ratio 1:10) with the nutrient solution. The mixture was shaken for 45 min using a rotary shaker at 16 rpm and centrifuged (20 min at 4 000 g). The soil solution samples were split into three aliquots. The first untreated and unfiltered aliquot was used for the pH analyses. The remaining aliquots were filtered at 0.45 μm (polyethersulfone membrane filter). The second aliquot was acidified with nitric acid (65%, for trace analysis Sigma Adrich) to quantify silver concentration in soil solution using ICP-MS spectrometry. The third aliquot was mixed with 10 μL sodium azide (final concentration in aliquot of $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) and used to quantify dissolved organic carbon content (TOC-L CSH, Shimadzu). The last two aliquots were maintained at 4 °C before analysis.

Statistics

Principal Components Analysis (PCA) was used to describe the data set and to reduce the dimensionality by projecting each sample onto the main principal components ([Ringner, 2008](#)). PCA was performed on 102 observations, each corresponding to an individual RHIZOtest experiment. The environmental variables (levels) were the soil type (clay, loam-high OM, sandy loam, and loam-high carbonate soils), the treatment (AgNO_3 , PVP-AgNPs, SiO_2 -AgNPs and controls), and the silver exposure concentration (0, 0.0015, 0.15 mg.kg^{-1}). The response variables were the Ag flux, the Ag concentration, pH and DOC in the soil solution and the plant mass (roots and leaves). As the response

variables were not dimensionally homogeneous, they were centered and scaled to unit variance. Analyses were carried out in the statistical environment R ([Team, 2011](#)) using packages *ade4* ([Thioulouse and Dray, 2007](#)) and *adegraphics* ([Dray et al., 2017](#)).

PCA analysis was completed by a Redundancy canonical Analysis (RDA) to study the relationships between the response variables and the environmental variables. The quantitative environmental variables concerned the soil parameters, i.e. the cationic exchange concentration (CEC), the percentage of clay and organic matter, the pH, the carbonate concentration, and the silver exposure concentration. The non-quantitative environmental variable was the treatment (same as those used in the PCA analysis). The RDA was implemented in XLSTAT 2015.6.

Differences among groups with multiple response variables were assessed using permutations-based multivariate analysis of variance (PERMANOVA, 1000 permutations) in *Vegan* ([Oksanen et al., 2013](#)).

The distribution of the investigated variables and residues was tested for normality using Shapiro-Wilk's test and for homoscedasticity using Levene's test. As the Ag flux fitted a non-normal distribution, we used non-parametric Kruskal-Wallis' test followed with Dunn's post hoc test in R environment ([Team, 2011](#)) for comparisons of Ag flux among the treatment groups. The p-values were corrected for false discovery rate due to multiple post-hoc comparisons using the Benjamini-Hochberg (BH) method ([Benjamini and Hochberg, 1995](#)). p-values or BH-corrected Dunn's post hoc test p-values under 0.05 were considered to be statistically significant.

Simple regression was implemented in StatGraphics Centurion XVI.II and XLSTAT to describe the relationships between the outcome variable Ag flux and the predictor variables Ag concentration applied or in soil solution among the treatment groups. The lack of fit test was used to assess whether the selected model adequately described the observed data. The Durbin-Watson statistic tested the residuals to determine any significant autocorrelation based on the order in which they occur in the data file.

RESULTS AND DISCUSSION

The soil type drives Ag phytoavailability at PEC and 100×PEC

Principal components analysis (PCA) was used to detect patterns in the dataset and to describe linear relations between the response variables (Ag flux, plant mass and Ag concentration, pH, and DOC in soil solution). The three first components (PC1, PC2, and PC3) retained 77.7% of the variability. The score plots showed a clustering based on soil type on the first component (see SI Figure S3). The correlation loading plots (see SI Figure S3) indicated no significant correlation of Ag flux or plant mass with the other variables (pH and DOC in soil solution, biomass).

To test the simultaneous response of the Ag flux variable to the environmental variables (soil characteristics, Ag treatments and concentrations), a permutation-based method (PERMANOVA) was used which requires the independence of the variables but not their normal distribution. According to the pseudo-Fisher-ratio (F) and the p-values, the PERMANOVA analysis revealed a highly significant effect of the Ag exposure concentration ($F=90.2$, $p\text{-value}<0.001$), the soil type ($F=15.0$, $p\text{-value}<0.001$) and the treatment ($F=7.1$, $p\text{-value}<0.001$) on the Ag flux. Removing the control values from the data set, the treatment no longer had an impact on the Ag flux variable ($p\text{-value}>0.05$), which showed that the silver phytoavailability was essentially the same for AgNPs (PVP and SiO₂-coated) and AgNO₃ treatments.

As none of the response variables were correlated, redundancy analysis (RDA) was used to describe the response variables (Ag flux, plant mass and Ag concentration, pH, and DOC in soil solution,) with the set of environmental variables (soil characteristics, Ag treatments and concentration), used as explanatory variables. The results of the RDA are displayed in Figure 3. The angle among response variables (black arrows) or environmental variables (red arrows) indicates the degree of linear correlation between them. The right-angled projection of centroid points (blue circles), standing for non-quantitative variables, onto a response variable (black arrows) approximates the relationship between these variables. The constrained part of the RDA explained 57.8% of the total variability. The first (F1) and second (F2) components retained 55.3% and 29.2% of the constrained variability, respectively. The pH and DOC in soil solution were the main contributors to F1 and the two were negatively correlated ($R=-0.92$, $R^2=0.85$). The Ag flux was the main contributor to F2 and was moderately correlated to the silver concentration in the soil solution ($R=0.73$, $R^2=0.53$) while independent of the DOC ($R=-0.49$, $R^2=0.24$) and of the pH in soil solution ($R=0.01$, $R^2=0.11$). The contribution of the plant mass variable was weak for both axes.

A permutation test showed a highly significant linear relationship between the response variables and the explanatory environmental variables ($p\text{-value}<0.0001$). The Ag flux was strongly positively correlated to the Ag exposure concentration ($R=0.97$, $R^2=0.95$), negatively correlated to the soil clay content ($R=-0.84$, $R^2=0.88$) and to the CEC ($R=-0.91$, $R^2=0.84$), and independent of the carbonate concentration ($R^2=0.04$) and the soil organic matter content ($R^2=0.05$). The silver concentration in the soil solution was best correlated to the clay content ($R=0.91$, $R^2=0.84$) and the Ag exposure concentration ($R=0.86$, $R^2=0.74$) while poorly to the other environmental variables ($R^2\leq 0.35$). The right-angled projections of the centroids for the Ag treatment variable set up a gradient along the Ag flux variable, with a negative contribution for controls (no Ag added), opposed to the clustered contributions for AgNO₃, SiO₂- and PVP-AgNPs. This highlights that AgNPs and AgNO₃ treatments showed similar trends regarding Ag flux. The right-angled projections of the centroids of the soil variable on the Ag flux brought out some soils: the clay soil that contributed negatively to the Ag flux and the loam-high carbonate soil that contributed positively. The same analysis regarding the

concentration of silver in soil solution variable emphasized the loam-high OM soil with a positive contribution and the clay soil and loam-high carbonate soil with negative and similar ones. As general trend, the clay soil gave the lowest Ag concentration in the soil solution and the lowest Ag flux, the loam-high carbonate soil lead to the lowest Ag concentration in soil solution but the highest Ag flux, and the loam-high OM induced a high Ag concentration in soil solution but a low Ag flux. The sandy loam soil contributed poorly to these two variables.

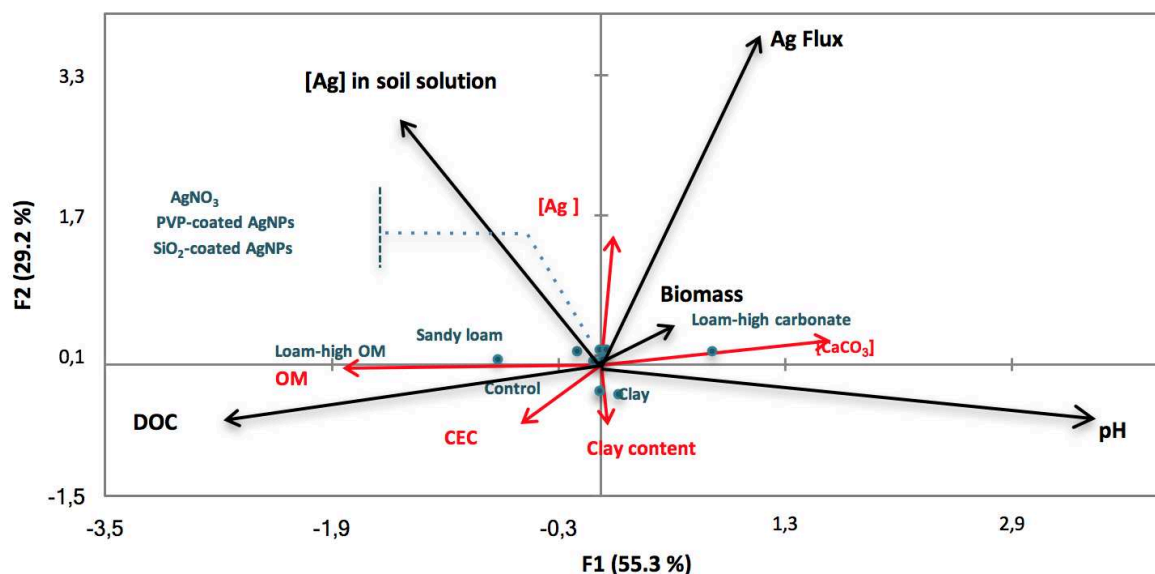


Figure 3. Redundancy Analysis ordination biplot showing the relationships of response variables (black arrows) to the explanatory quantitative (red arrows) and non-quantitative environmental variables (centroids as blue circles).

At PEC, AgNPs and AgNO₃ phytoavailability is indistinguishable from geogenic silver

In the literature, the lowest Ag concentration used in soil-plant transfer is 0.5 mg.kg⁻¹ in a sand matrix (Dimkpa et al., 2011). Herein, we used the RHIZOtest as a bioassay to detect differences in Ag phytoavailability between treatments within the range of AgNPs PEC in agricultural soils (Gottschalk et al., 2015). Figure 4 shows the relationship between the silver flux as function of soil type and modalities. A modality is defined here as a silver treatment at a given exposure concentration. For the lowest concentration tested (0.0015 mg.kg⁻¹), the Ag flux induced by AgNPs (SiO₂- or PVP-coated) or AgNO₃ did not significantly differ (p-value>0.05) from the controls (no Ag added).

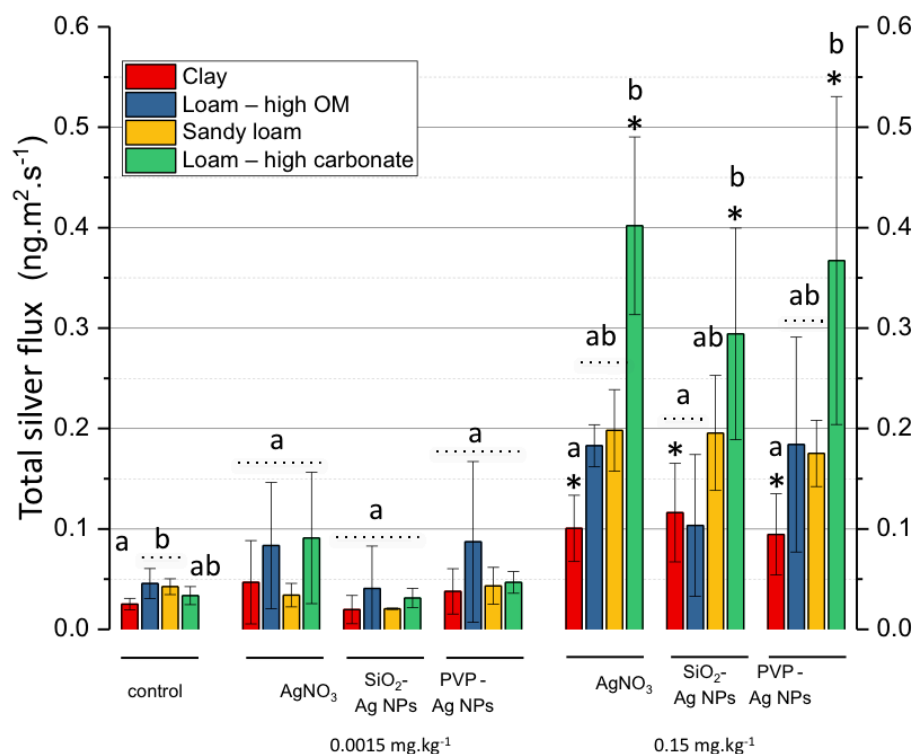


Figure 4. Total silver flux ($\text{ng.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) achieved in fescue on four soils ($n=3$ to 5 , $\pm\text{SD}$). A modality is defined here as a silver treatment at a given exposure concentration. Different letters represent significant differences (Kruskal-Wallis test) between soils in each modality. * represent significant differences (Kruskal-Wallis test) compared to control.

At PEC and 100×PEC, the Ag concentration in soil solution drives the phytoavailability

Figure 4 also show that, for half of the treatments (6 out of 12), Ag fluxes in fescue exposed to 0.15 mg.kg^{-1} of silver (100×PEC), as AgNO_3 or AgNPs, were significantly higher than control groups. This result highlights the sensitivity of the RHIZOtest as a bioassay to detect differences in phytoavailability between treatments, even at a Ag exposure concentration lowest than the ones already published. At 0.15 mg.kg^{-1} the Ag flux showed a soil-dependent trend. The Ag fluxes in fescue exposed in the clay and the loam-high carbonate soils differed from the controls, whatever the Ag treatment. In contrast, the Ag flux for fescues exposed in the loam-high OM or the sandy soils were not significantly different from those of controls.

The Ag flux also followed a dose-dependent pattern, and increased as function of the Ag exposure concentration. To improve the normality of the data distribution, a LOG transformation of the variables Ag flux, Ag exposure concentration, and Ag concentration in soil solution was applied (Figure 5). Regardless of the modality and the soil type, a Pearson correlation measuring the strength of the association between two variables, showed a strong relationship between the Ag flux in plant and the concentration of Ag in the soil solution ($R=0.94$, $R^2=0.88$) (Figure 4 and 5). In more details, the linear model showed a decreasing fitting for the sandy-loam soil ($R^2=0.96$), the clay-loam and

loam-high OM ($R^2=0.92$ and 0.91), then to the loam-high carbonate soil ($R^2=0.80$). Thus, even if the Ag concentration in the soil solution explained a large part of the variability in Ag flux, this was modulated by the soil type, and did not account for some portion of the variability, as already shown by the RDA analysis.

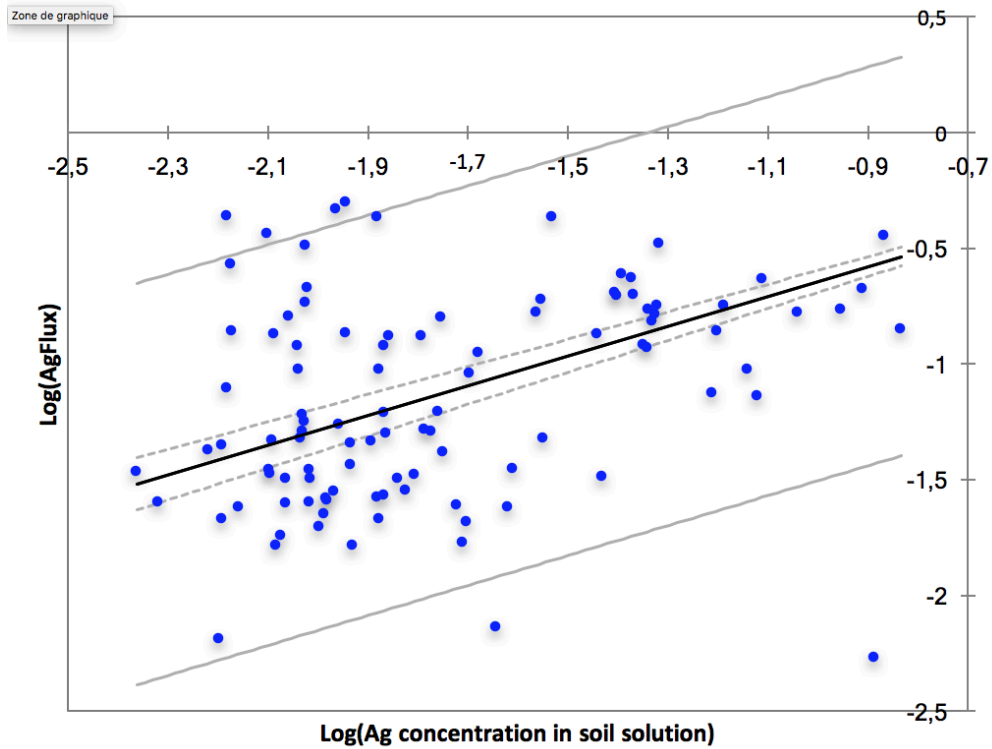


Figure 5. LOG-LOG scale plot of the relationships between the Ag flux in plants and the concentration of Ag in the soil solution. Blue dots represent the experimental data and the bold line the linear model. Grey lines represent the confidence intervals (95%) for the observations. The equation is

$$\text{Log}_{Ag \text{ flux}} = 0.64 \times \text{Log}_{[Ag] \text{ in soil solution}}, R^2=0.88.$$

At 100×PEC, clays in soil impedes Ag phytoavailability

Figure 4 shows that for given modality, Ag fluxes always increased between clay soil < loam-high OM soil < sandy soil < loam-high carbonate soil (Ag fluxes being significantly lower in the clay soil than in the loam-high carbonate soil). Figure 6 shows the Ag concentration in soil solution as function of exposure concentration and highlights a repetitive pattern for a given modality. Significant lower Ag concentration in soil solution were measured in the clay soil and loam-high carbonate soil compared to sandy soil and loam-high OM soil. The Ag concentrations in soil solution were always non-statistically different ($p\text{-value} > 0.05$) in clay soil and loam-high carbonate soil, while the Ag fluxes were lower in the clay soil. Clay and loam-high carbonate soils mainly differed by their clay content, CEC, and carbonate contents (Figure 2). The CEC arises from various negative charges on

soil particle surfaces, especially those of clay minerals and soil organic matter. Together with the RDA analysis, these results show that interactions between Ag and clay minerals hindered the Ag flux, and suggest a potential role of carbonates in soil in Ag phytoavailability.

Several studies highlighted the major role of soil physicochemical properties in the mobility of Ag NPs in natural soils. Using three soils with properties gradients (pH 4.6 to 8, clay content 12 to 27%, CEC 8.5 to 15 cmol.kg⁻¹, organic matter content 0.66 to 2.5%), [Wang et al. \(2015a\)](#) correlated the mobility of PVP-AgNPs positively with pH, CEC, and organic matter content. [Cornelis et al. \(2012\)](#) used a larger set of 16 natural soils with a broader range of chemical and physical properties (pH 4 to 7.58, clay content 1 to 59%, CEC 0.2 to 65.7 cmol.kg⁻¹, carbon content 0.9 to 7%). They correlated the partition of Ag with the soil clay content and suggested a preferential adsorption of the negatively charged citrate-coated AgNPs on the positively-charged surface sites of clay-sized minerals. Recently, [Zhou et al. \(2012a\)](#) demonstrated that negatively-charged AgNPs do not alter the stability of Montmorillonite clay at pH 8, but interacted with the edges of clays and coagulated at pH 4. At the apex of plant roots, exudation of protons and organic acids usually decreases locally the pH near to 4.5 to enable the uptake of nutrients. This suggests that even if clays may not interact with Ag at the pH of the clay soil (pH 7.45) and loamy-high carbonate soil (pH 7.97), they could locally favor Ag immobilization at the vicinity of the root apex due to the plant exudation and pH decrease.

In loam-high carbonate soil (with low clay content), the formation of Ag₂CO₃ could account for the low Ag concentration in the soil solution observed at 0.15 mg.kg⁻¹ of AgNO₃, PVP- and SiO₂-AgNPs. [Sekine et al. \(2014\)](#) carefully studied carbonates-Ag interactions in neutral (pH 6.9) and alkaline soil (pH 7.8). Ag₂CO₃ was only detected in the soils freshly spiked with AgNO₃ followed by a disappearance after three months of incubation. In our loam-high carbonate soil, the decrease in pH at the vicinity of the root apex could favor Ag₂CO₃ dissolution and could drive the Ag phytoavailability. This hypothesis could explain the high fluxes observed for fescue in the loam-high carbonate soil in spite of the low Ag concentration in the soil solution.

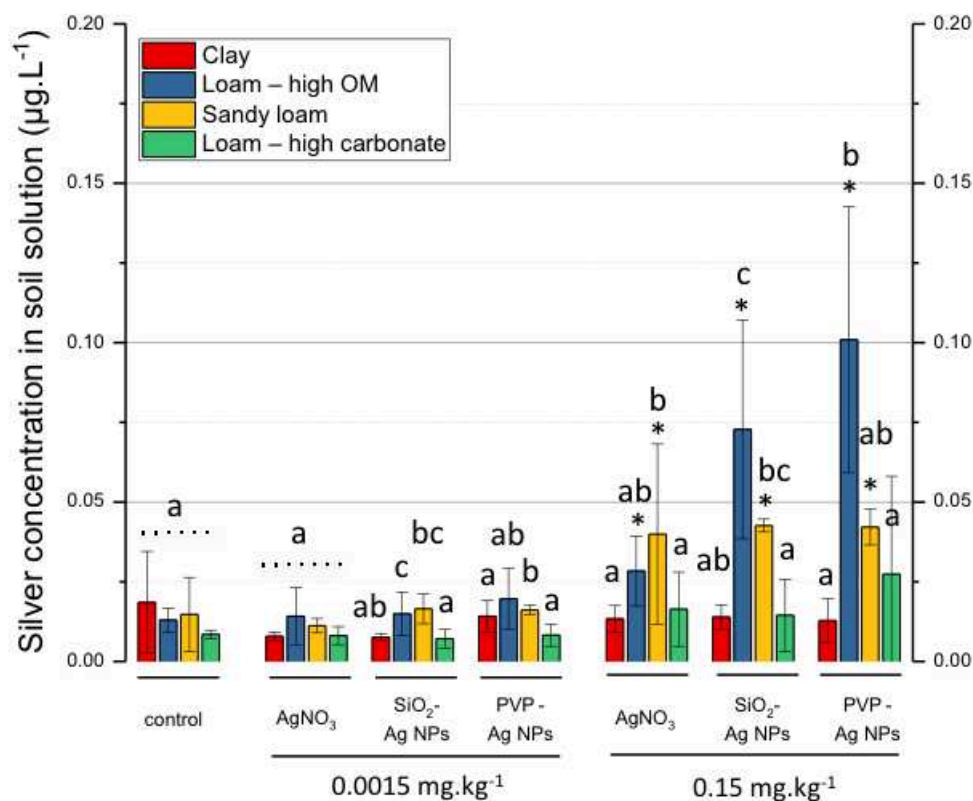


Figure 6. Total silver concentration in soil solution ($\mu\text{g.L}^{-1}$) on the four soils (A and B) ($n=5$, $\pm\text{SD}$). A modality is defined here as a silver treatment at a given exposure concentration. Different letters represent significant differences (Kruskal-Wallis test) between soils in each modality. * represent significant differences (Kruskal-Wallis test) compared to control.

At 100xPEC Ag from AgNO_3 and Ag NPs is similarly translocated in fescue shoot

Figure 7 reports the silver concentrations in roots and shoots of fescue, exposed to AgNPs and AgNO_3 at PEC and 100xPEC, in the different soils. The silver concentrations in roots paralleled the trend observed for Ag Flux, already discussed in the previous sections. A PERMANOVA analysis revealed a significant impact of the Ag exposure concentration ($F=13.1$, $p\text{-value}<0.0001$), soil type ($F=4.1$, $p\text{-value}<0.01$), and treatment ($F=3.3$, $p\text{-value}<0.01$), on Ag concentration in shoots. The silver concentration in shoots showed no linear correlation with the concentration of Ag in roots ($R=0.32$, $R^2=0.09$).

For the 100xPEC, in 4 over 12 modalities, the concentrations of Ag in shoots were significantly higher than those of the respective controls, as in the loam-high carbonate soil for both Ag NPs (PVP- and $\text{SiO}_2\text{-AgNPs}$) and AgNO_3 and for the clay soil for $\text{SiO}_2\text{-AgNPs}$. This highlights that soil parameters prevail over silver forms (nanoparticulate or dissolved), in Ag translocation to plant shoots.

In conclusion, we can assume the following potential mechanisms. Both clays and carbonate ions could interact with silver in soils and decrease its concentration in the soil solutions studied (Figure 6). In clay soils, local pH decrease near the roots would favor its immobilization by the edge of the clays and decrease its phytoavailability by fescue (Figure 4 and 7). However, in the loam-high carbonate soil, plant exudation near the roots would favor Ag release from Ag_2CO_3 and its interaction with the roots and also translocation to the shoots (Figure 4 and 7).

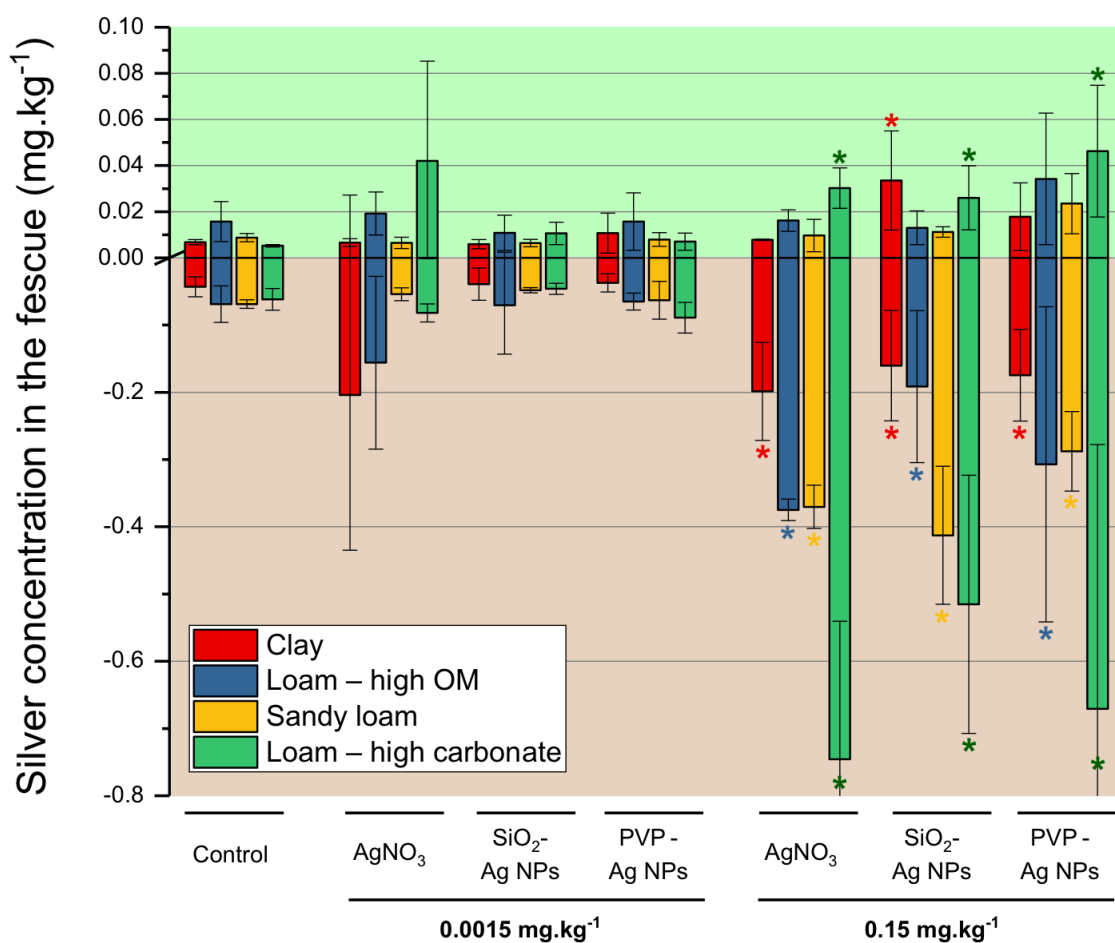


Figure 7. Silver concentration in leaves (green background) and roots (pink background) (mg.kg⁻¹) on the four soils (n=5, \pm SD) in fescue. * represent significant differences (Kruskal-Wallis test) compared to control.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the French Environment and Energy Management Agency (ADEME) and Labex Serenade (funded by the «Investissements d’Avenir» French Government program of the French National Research Agency (ANR-11-LABX-0064) through the A*MIDEX project (ANR-11-IDEX-0001-02)) for Clément Layet’s PhD grant. The authors acknowledge INSU (CNRS) for funding the study via the EC2CO-ECODYN call. The authors acknowledge the CNRS funding for the GDRi iCEINT, and the OSU-Institut Pythéas. We also thank X. Lacan and C. Villefranque from RAGT semences who kindly provided the tall fescue seeds and the European Synchrotron Radiation Facility for access to the synchrotron radiation facilities.

REFERENCES

- Ahlberg, S., Antonopulos, A., Diendorf, J., Dringen, R., Epple, M., Flöck, R., Goedecke, W., Graf, C., Haberl, N., Helmlinger, J., Herzog, F., Heuer, F., Hirn, S., Johannes, C., Kittler, S., Köller, M., Korn, K., Kreyling, W. G., Krombach, F., Lademann, J., Loza, K., Luther, E. M., Malissek, M., Meinke, M. C., Nordmeyer, D., Paillart, A., Raabe, J., Rancan, F., Rothen-Rutishauser, B., Rühl, E., Schleh, C., Seibel, A., Sengstock, C., Treuel, L., Vogt, A., Weber, K., and Zellner, R. (2014). PVP-coated, negatively charged silver nanoparticles: A multi-center study of their physicochemical characteristics, cell culture and in vivo experiments. *Beilstein Journal of Nanotechnology* **5**, 1944-1965.
- Basta, N. T., Ryan, J. A., and Chaney, R. L. (2005). Trace element chemistry in residual-treated soil: Key concepts and metal bioavailability. *Journal of Environmental Quality* **34**, 49-63.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. Roy. Statist. Soc. Ser.* **57**, 289–300.
- Benoit, R., Wilkinson, K. J., and Sauvé, S. (2013). Partitioning of silver and chemical speciation of free Ag in soils amended with nanoparticles. *Chemistry Central Journal* **7**, 75.
- Cornelis, G., Doolette, C., Thomas, M., McLaughlin, M., Kirby, J., Beak, D., and Chittleborough, D. (2012). Retention and dissolution of engineered silver nanoparticles in natural soils. *Soil Sci Soc Amer J* **76**, 891–902.
- Cornelis, G., Pang, L., Doolette, C., Kirby, J. K., and McLaughlin, M. J. (2013). Transport of silver nanoparticles in saturated columns of natural soils. *Science of The Total Environment* **463**, 120-130.
- Cox, A., Venkatachalam, P., Sahi, S., and Sharma, N. (2016). Silver and titanium dioxide nanoparticle toxicity in plants: a review of current research. *Plant Physiology and Biochemistry* **107**, 147-163.
- Dimkpa, C. O., Calder, A., Gajjar, P., Merugu, S., Huang, W., Britt, D. B., McLean, J. E., Johnson, W. P., and Anderson, A. J. (2011). Interaction of silver nanoparticles with an environmentally beneficial bacterium, *Pseudomonas chlororaphis*. *Journal of Hazardous Materials* **188**, 428–435.
- Dimkpa, C. O., McLean, J. E., Martineau, N., Britt, D. W., Haverkamp, R., and Anderson, A. J. (2013). Silver Nanoparticles Disrupt Wheat (*Triticum aestivum* L.) Growth in a Sand Matrix. *Environmental Science & Technology* **47**, 1082-1090.
- Doolette, C. L., McLaughlin, M. J., Kirby, J. K., and Navarro, D. A. (2015). Bioavailability of silver and silver sulfide nanoparticles to lettuce (*Lactuca sativa*): Effect of agricultural amendments on plant uptake. *Journal of Hazardous Materials* **300**, 788-795.
- Dray, S., Dufour, A.-B., and Thioulouse, J. (2017). Analysis of Ecological Data : Exploratory and Euclidean Methods in Environmental Sciences. *R package Version* **1.7-6**.
- Gottschalk, F., Lassen, C., Kjoelholt, J., Christensen, F., and Nowack, B. (2015). Modeling Flows and Concentrations of Nine Engineered Nanomaterials in the Danish Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **12**, 5581-5602.

ISO-16198 (2015). Soil quality - Plant-based test to assess the environmental bioavailability of trace elements to plants.

Kah, M., and Hofmann, T. (2014). Nanopesticide research: Current trends and future priorities. *Environment International* **63**, 224-235.

Kosmulski, M. (2003). A literature survey of the differences between the reported isoelectric points and their discussion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **222**, 113-118.

Layet, C., Auffan, M., Santaella, C., Chevassus-Rosset, C., Montes, M., Ortet, P., Barakat, M., Collin, B., Legros, S., Bravin, M. N., Angeletti, B., Kieffer, I., Proux, O., Hazemann, J.-L., and Doelsch, E. (2017). Evidence that Soil Properties and Organic Coating Drive the Phytoavailability of Cerium Oxide Nanoparticles. *Environmental Science & Technology*.

Lee, W. M., Kwak, J. I., and An, Y. J. (2012). Effect of silver nanoparticles in crop plants *Phaseolus radiatus* and *Sorghum bicolor*: Media effect on phytotoxicity. *Chemosphere* **86**, 491-499.

Levard, C., Hotze, E. M., Lowry, G. V., and Brown, G. E. (2012). Environmental Transformations of Silver Nanoparticles: Impact on Stability and Toxicity. *Environmental Science & Technology* **46**, 6900-6914.

Lok, C.-N., Ho, C.-M., Chen, R., He, Q.-Y., Yu, W.-Y., Sun, H., Tam, P. K.-H., Chiu, J.-F., and Che, C.-M. (2006). Proteomic Analysis of the Mode of Antibacterial Action of Silver Nanoparticles. *Journal of Proteome Research* **5**, 916-924.

Ma, X., Geiser-Lee, J., Deng, Y. F., and Kolmakov, A. (2010). Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of The Total Environment* **408**, 3053–3061.

Meier, C., Voegelin, A., Pradas del Real, A., Sarret, G., Mueller, C. R., and Kaegi, R. (2016). Transformation of silver nanoparticles in sewage sludge during incineration. *Environmental science & technology* **50**, 3503-3510.

Oksanen, J. F., Blanchet, G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Henry, M. H. S., Szoecs, E., and Wagner, H. (2013). vegan: Community Ecology Package. *R package Version* **2.4-3**.

Pradas del Real, A. E., Castillo-Michel, H., Kaegi, R., Sinnet, B., Magnin, V., Findling, N., Villanova, J., Carrière, M., Santaella, C., Fernández-Martínez, A., Levard, C., and Sarret, G. (2016). Fate of Ag-NPs in Sewage Sludge after Application on Agricultural Soils. *Environmental Science & Technology* **50**, 1759-1768.

Pradas del Real, A. E., Vidal, V., Carrière, M., Castillo-Michel, H., Levard, C., Chaurand, P., and Sarret, G. (2017). Silver Nanoparticles and Wheat Roots: A Complex Interplay. *Environmental Science & Technology* **51**, 5774-5782.

Pulit-Prociak, J., and Banach, M. (2016). Silver nanoparticles – a material of the future...? In "Open Chemistry", Vol. 14, pp. 76.

Ringner, M. (2008). What is principal component analysis? *Nat Biotech* **26**, 303-304.

Schlich, K., Hoppe, M., Kraas, M., Fries, E., and Hund-Rinke, K. (2017). Ecotoxicity and fate of a silver nanomaterial in an outdoor lysimeter study. *Ecotoxicology* **26**, 738-751.

Sekine, R., Brunetti, G., Donner, E., Khaksar, M., Vasilev, K., Jamting, Å. K., and Lombi, E. (2014). Speciation and lability of Ag-, AgCl-, and Ag₂S-nanoparticles in soil determined by X-ray absorption spectroscopy and diffusive gradients in thin films. *Environmental science & technology* **49**, 897-905.

Stegemeier, J. P., Schwab, F., Colman, B. P., Webb, S. M., Newville, M., Lanzirotti, A., Winkler, C., Wiesner, M. R., and Lowry, G. V. (2015). Speciation Matters: Bioavailability of Silver and Silver Sulfide Nanoparticles to Alfalfa (*Medicago sativa*). *Environmental Science & Technology* **49**, 8451-8460.

Sun, T. Y., Gottschalk, F., Hungerbühler, K., and Nowack, B. (2014). Comprehensive probabilistic modelling of environmental emissions of engineered nanomaterials. *Environmental Pollution* **185**, 69-76.

Team, R. D. C. (2011). R: A Language and Environment for Statistical Computing. (t. R. F. f. S. Computing, ed.), Vienna, Austria.

Thioulouse, J., and Dray, S. (2007). Interactive multivariate data analysis in R with the ade4 and ade4TkGUI packages. *Journal of Statistical Software* **22**, 1-14.

- Vance, M. E., Kuiken, T., Vejerano, E. P., McGinnis, S. P., Hochella, M. F., Rejeski, D., and Hull, M. S. (2015). Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology* **6**, 1769-1780.
- Wang, D., Jaisi, D. P., Yan, J., Jin, Y., and Zhou, D. (2015). Transport and Retention of Polyvinylpyrrolidone-Coated Silver Nanoparticles in Natural Soils. *Vadose Zone Journal* **14**.
- Wang, J., Koo, Y., Alexander, A., Yang, Y., Westerhof, S., Zhang, Q. B., Schnoor, J. L., Colvin, V. L., Braam, J., and Alvarez, P. J. J. (2013). Phytostimulation of Poplars and Arabidopsis Exposed to Silver Nanoparticles and Ag⁺ at Sublethal Concentrations. *Environmental Science & Technology* **47**, 5442-5449.
- Zhou, D., Abdel-Fattah, A. I., and Keller, A. A. (2012). Clay particles destabilize engineered nanoparticles in aqueous environments. *Environmental science & technology* **46**, 7520-7526.

Chapitre V : Discussion, conclusion et perspectives

La finalité de ces travaux de thèse était de déterminer l'influence de plusieurs paramètres environnementaux et des propriétés intrinsèques des NMs, sur la phytodisponibilité des NMs. On considère parmi les paramètres principaux, la sous classe de la plante, la présence d'enrobage, la nature et structure des NMs, ainsi que le type de sol sur lequel sont cultivées les plantes. Afin de déterminer la significativité de ces multiples paramètres, nous devons mettre en jeu un nombre d'échantillons conséquent et aisément exploitable tout en ayant la possibilité d'étudier l'environnement parcouru par les NMs depuis le sol vers la plante (solution du sol, racines, tiges). Pour cela nous avons adapté le dispositif du RHIZOtest à la culture de plantes sur des sols volontairement contaminés par différents NMs. Nous présentons ici les principaux résultats obtenus, et les possibilités d'amélioration de l'étude de la phytodisponibilité avec le RHIZOtest.

V.1 Influence de la sous classe des plantes sur la phytodisponibilité des NMs

Lors de la première campagne, nous avons comparé la disponibilité des NMs de CeO_2 entre la tomate (dicotylédone) et la fêtuque (monocotylédone). Le flux total de cérium était statistiquement identique entre la tomate et la fêtuque. Comme nous l'avons indiqué dans la [partie I.4](#), les comparaisons entre les dicotylédones et les monocotylédones apportent des conclusions différentes ([Lopez-Moreno et al., 2010a](#); [Schwabe et al., 2013](#)). En utilisant le RHIZOtest, la surface de contact entre les racines et le sol est uniformisée entre les plantes. La surface racinaire est un des facteurs pouvant expliquer la différence de concentration entre les plantes ([Schoonderbeek and Schoute, 1994](#)). De plus, la différence entre les monocotylédones et les dicotylédones réside en partie dans les exsudats racinaires différents, liées à des stratégies spécifiques de prélèvement des éléments. Nous avons cité l'exemple du prélèvement du fer ([partie I.3.b](#)). Les dicotylédones peuvent modifier le pH du sol en extrudant des protons, ou en sécrétant des agents chélatants pour mobiliser le fer (stratégie I). Les monocotylédones sécrètent des phytosidérophores pouvant complexer avec le fer et favoriser son absorption (stratégie II) ([Puschenreiter et al., 2017](#)). Or ces stratégies sont mises en place lorsque les plantes subissent un déficit en fer. Dans le protocole du RHIZOtest, la plante est alimentée avec une solution contenant du fer ($\text{Fe}^{3+}(\text{EDTA})$) pendant la période de croissance en hydroponie (une semaine). Il pourrait être envisageable que cette exposition limite la demande en fer durant la période de contact avec le sol, malgré l'absence de fer dans la solution nutritive. Une étude utilisant le RHIZOtest a comparé les communautés microbiennes dans deux sols cultivés avec la tomate (dicotylédone) ou l'orge (monocotylédone) ([Pii et al., 2016](#)). Les sols étaient irrigués avec une solution nutritive de croissance respectant le protocole et une solution sans $\text{Fe}^{3+}(\text{EDTA})$). Les résultats démontrent que les communautés microbiennes diffèrent en fonction de l'espèce de la plante, du type de sol, et de la composition de la solution nutritive de croissance. La sous classe de la plante peut donc, malgré une

alimentation antérieure en fer, induire des communautés microbiennes différentes dans les sols. Cette communauté peut être liée aux exsudats, sachant que les deux communautés microbiennes dans les rhizosphères sont différentes de celle retrouvée dans les sols non cultivées (bulk soils). Une identification des acides organiques dans la solution du sol est donc nécessaire, mais il semble que les précédents travaux utilisant le RHIZOtest démontrent que les protocoles permettent une différenciation des communautés microbiennes en fonction des plantes cultivées.

Nous n'avons pas fait la distinction entre les particules de CeO_2 absorbées par la plante et celles adsorbées à la surface des racines. [Zhu et al. \(2012\)](#) ont déterminé l'efficacité de prélèvement (différence entre les particules absorbées et adsorbées aux racines) de NMs d'Au en mettant en contact les racines de deux monocotylédones (riz et ray grass), et deux dicotylédones (radis et citrouille) avec une solution de $\text{KI}+\text{I}_2$. L'efficacité de prélèvement est différente entre les plantes en fonction de la charge de surface des NMs d'Au. Il n'y a cependant pas de distinction significative entre les efficacités de prélèvement des monocotylédones et des dicotylédones. Un protocole de désorption des NMs à la surface des racines serait donc à envisager pour chaque élément étudié.

V.2 Influence de la formulation des NMs sur leur phytodisponibilité

Des enrobages autour des particules ont été étudiés lors des RHIZOtest utilisant des NMs de CeO_2 (enrobage de citrate) et d'argent (enrobage de PVP et de SiO_2). Dans le cas des NMs de CeO_2 , nous avons mis en évidence que l'enrobage de citrate augmentait le flux de NMs dans la tomate et la fétuque cultivées sur un arenosol. Cette augmentation de flux n'était plus visible avec le brunisol, plus riche en matière organique dissoute. Nous avons supposé que la concentration en matière organique dissoute étant plus importante dans ce sol, elle jouait le même rôle d'enrobage que le citrate, favorisant dans la même mesure la phytodisponibilité des NMs. Dans le cas des NMs d'argent, nous avons montré que l'enrobage, à la plus forte concentration d'exposition, n'induisait pas de phytodisponibilité différente du nitrate d'argent.

Si nous souhaitons nous rapprocher d'un scénario d'exposition réaliste, il convient de considérer les concentrations d'exposition dans les sols les plus basses. Dans ce cas, la formulation a un impact plus limité en ce qui concerne la phytodisponibilité des NMs. Avec les NMs de CeO_2 (1 mmg.kg^{-1}), l'enrobage induit un flux plus important uniquement avec l'arenosol. Les NMs d'argent enrobés de PVP ou de SiO_2 , et le traitement AgNO_3 induisent des flux équivalents aux échantillons témoins. Quant aux NMs de TiO_2 , nous n'avons pas observé de différence significative de flux entre les traitements et les témoins à 1 mg.kg^{-1} . Nous n'avons en revanche pas évalué une quelconque toxicité au niveau de la physiologie de la plante ou des communautés bactériennes de la rhizosphère. Une baisse de la biomasse de la fétuque exposée aux NMs de TiO_2 a été observée, mais avec un ratio de Fischer limité comparé aux autres facteurs (sol, concentration d'exposition), et restreinte à un seul sol sur quatre (« clay soil »). Plusieurs travaux effectués à des concentrations proches des scénarii réalistes

ont mis en évidence des effets des NMs sur des organismes ([Burke et al., 2014](#); [Colman et al., 2013](#); [Saini et al., 2016](#); [Yang et al., 2017](#)). De plus, notre étude a été limitée dans le temps, ce qui ne nous permet pas d'établir de conclusion sur une éventuelle toxicité à plus long terme avec le RHIZOtest.

V.3 Influence des propriétés des sols sur la phytodisponibilité des NMs

Nous avons pu démontrer que la nature des sols constitue un facteur prépondérant de régulation de la phytodisponibilité des NMs. Dans deux études sur trois (NMs de CeO_2 , et Nms d'Ag) il s'agit du facteur ayant un ratio de Fischer le plus important dans les deux cas, derrière la concentration d'exposition utilisée. Nous avons également observé que les propriétés physico-chimiques des sols pouvaient modifier la phytodisponibilité des NMs en régulant la capacité des plantes à prélever les particules, ou en régulant la rétention au niveau de la phase solide.

Avec les NMs de CeO_2 , nous avons montré que la concentration en matière organique dissoute permet de jouer le même rôle d'enrobage et favorise la disponibilité en limitant l'agrégation des particules. Dans le cas des NMs d'argent, nous avons établi que les NMs d'argent étaient moins disponibles pour les sols ayant un plus grand taux d'argile. Ceci peut être lié au pH, plus bas à proximité de la plante, et favorisant l'interaction entre les argiles et Ag^+ .

Plusieurs études ont démontré que le taux d'argile ou la CEC sont des facteurs favorisant la rétention des NMs dans les sols ([Cornelis, 2015](#); [Cornelis et al., 2013](#)). Néanmoins il existe d'autres facteurs pouvant modifier la dynamique des NMs dans les sols. Dans le cas des NMs de TiO_2 , nous avons observé une phytodisponibilité moins importante sur les sols ayant les taux d'argile les moins importants. Cet effet n'est cependant visible qu'à la plus forte concentration d'exposition (150mg.kg^{-1}). De plus, [Chen et al. \(2015\)](#) ont mis en évidence que le phosphate peut être adsorbé autour de la particule de TiO_2 , et favoriser sa mobilité dans le sable en limitant l'agrégation et la rétention par les particules du sol. Le protocole du RHIZOtest impose une alimentation du sol par une solution nutritive contenant du phosphate de monopotassium, on ne peut faire la distinction entre les différents sols étudiés.

Analyser un milieu aussi complexe que le sol requiert un grand nombre d'échantillons pour pouvoir définir plus précisément les différents paramètres jouant sur la phytodisponibilité d'un élément. Ce type d'étude a déjà été effectué avec le RHIZOtest ([Bravin et al., 2010](#)). Les auteurs ont utilisé un éventail de sols issus de 44 sites différents, sous culture de blé, et ont déterminé les facteurs principaux régulant la phytodisponibilité du cuivre. Les résultats démontrent une disponibilité principalement liée à la concentration totale en cuivre dans le sol. Il est donc envisageable, en multipliant le nombre d'échantillons de sols de déterminer plus précisément les facteurs du sol régulant la phytodisponibilité des sols avec le RHIZOtest.

V.4 Perspectives

Grâce au RHIZOtest, nous avons été capables de déterminer la phytodisponibilité de NMs, ayant des formulations différentes (Figure 14).

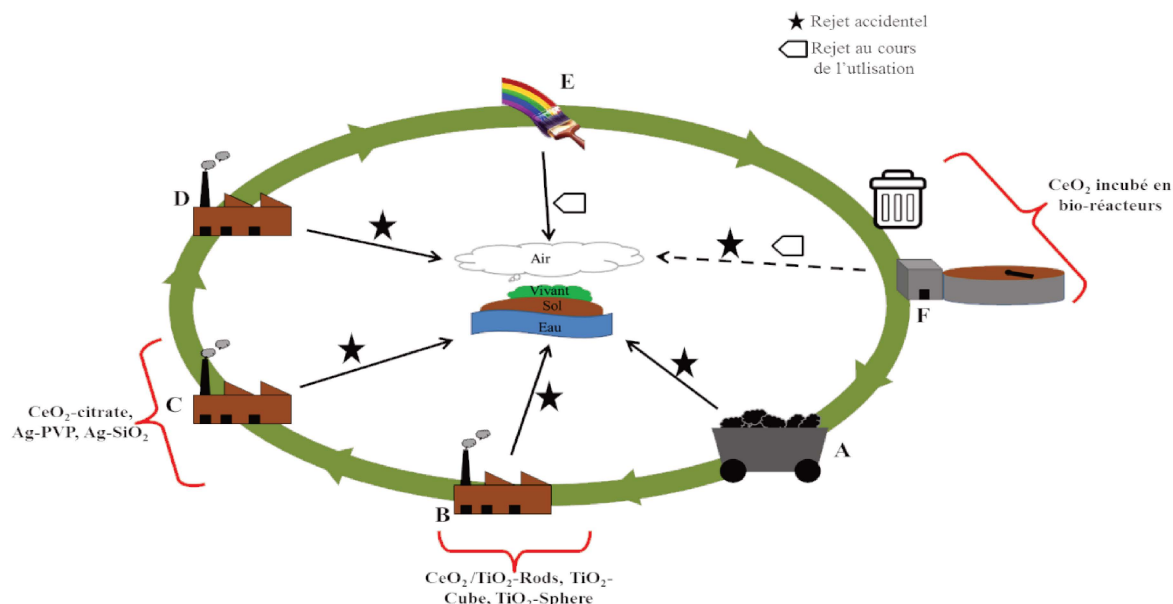


Figure 14: cycle de vie d'un nanomatériau, comprenant une phase d'extraction (A), de production des NMs primaires sans enrobage (B), de formulation (C), de fabrication des produits (dispersion des NMs dans une matrice) (D), d'utilisation du produit (E), et d'une fin de vie (recyclage/traitement des déchets, mise en décharge) (F).

Lors de l'étude des NMs de CeO_2 , l'utilisation de trois différentes spéciations du cérium (enrobé, non enrobé, et cérium dissous), nous a permis de déterminer la phytodisponibilité du CeO_2 à trois stades différents de l'utilisation. Le CeO_2 utilisé peut être rejeté dans l'environnement sous sa forme sans enrobage, sous sa forme enrobée lors de son utilisation (inclus dans les peintures de revêtement), ou bien sous une de ses formes possibles en fin de vie, après avoir subi différents processus d'altérations. Le cérium dissous (Ce^{3+}), dont nous avons comparé la phytodisponibilité à celles des NMs de CeO_2 , fait partie des formes possibles du matériau en fin de vie. Dans le cas de l'argent, nous avons également utilisé deux formulations commerciales de NMs, que nous pouvons retrouver intégrés dans des produits de consommation, et de l'argent dissous Ag^+ qui peut résulter de NMs en fin de vie. Néanmoins, ces espèces dissoutes sont susceptibles d'interagir avec leur environnement, donnant des espèces chimiques variées en fonction du cycle de vie du matériau (Hendren et al., 2015). Connaître plus précisément le devenir dans l'environnement à chaque stade du cycle de vie d'un NMs peut permettre de déterminer avec plus de précision son transfert dans les chaînes trophiques et prédire d'autant mieux les concentrations dans les différents compartiments d'un écosystème. Le RHIZOtest a l'avantage supplémentaire d'étudier le transfert sol-plante des NMs avec des concentrations plus proches des concentrations en NMs dans les sols déjà évaluées. Il nous a été possible par exemple de déterminer des effets significatifs de l'enrobage de CeO_2 à une concentration d'exposition proche des

concentrations évaluées (1 mg.kg^{-1}). La validation du RHIZOtest en tant qu'outils de la phytodisponibilité des NMs nous permet désormais d'élargir le champ des études des interactions entre les NMs et la plante.

V.4.a Etudier la phytodisponibilité des nanomatériaux en fonction de leur stade de vie

Comme nous l'avons vu précédemment, déterminer le devenir des NMs dans l'environnement nécessite de connaître la phytodisponibilité des différentes formes d'une particule au cours de son cycle de vie. La spéciation des particules va dépendre en partie des voies de rejet. Nous avons donc voulu déterminer quel pouvait être l'impact de NMs de CeO_2 sur l'environnement, ayant été épanchés sur un sol dans des boues de stations d'épuration ([Figure 14F](#)). Nous avons donc simulé le traitement de boues de stations d'épuration dans lesquelles nous avons ajouté progressivement des NMs de CeO_2 . Nous avons ensuite réalisé un épandage de boues (phase sèche) dans des sols que nous avons cultivés avec la même variété de fétuque élevée (*Festuca arundinacea*). Les résultats sont encore en cours de traitement (voir [Annexe V](#)).

V.4.b Améliorer la formulation d'un nanomatériau en fonction de sa phytodisponibilité, évaluée en RHIZOtest

La possibilité d'étudier facilement et avec un poids statistique satisfaisant (facilité de récolte, exploitation des données du sol à la plante, mise en place d'un grand nombre d'échantillons) pourrait permettre à l'avenir, dans le cadre de la conception « Safer by design », de déterminer l'impact de la nature et de la formulation de NMs sur leur phytodisponibilité, conditionné par le type de sol ou la sous classe de la plante. L'objectif étant de limiter les possibilités de toxicité ou de transfert des NMs dans les chaînes trophiques, le RHIZOtest peut être un outil permettant de vérifier rapidement l'efficacité d'une formulation spécifique des NMs, à des concentrations proches des concentrations estimées dans l'environnement.

V.4.c Comparer les résultats du RHIZOtest à des outils de plus grande échelle : le functional assay

Les différents résultats issus de l'utilisation du RHIZOtest donnent à cet outil la possibilité, dans le cas des NMs, de constituer un « functional assay » (FAs). Cette notion a été définie par [Hendren et al. \(2015\)](#), dans le cadre de l'étude des NMs. Les auteurs définissent un FAs comme un protocole permettant de quantifier l'effet de différents paramètres sur un processus ou une fonction ayant lieu dans un environnement donné. Ils peuvent être donc utilisés pour définir et quantifier les variables régulant le transport, la transformation et la réactivité des NMs dans un environnement spécifique. Un FAs doit remplir trois critères afin de satisfaire à l'étude à savoir, i) un protocole dont l'obtention de certaines variables est standardisée, ii) l'utilisation d'un système de référence (dans notre cas, il s'agirait du dispositif dans lequel est cultivé la plante), iii) et la définition de paramètres pouvant déterminer le devenir des NMs. Les auteurs précisent également qu'il est nécessaire de répéter les études en utilisant des FAs basés sur des systèmes différents ou de plus en plus complexes. Il a été envisagé durant la thèse de mettre en parallèle les résultats issus des travaux de Niall O'Brien (Duke

University) qui a comparé la phytodisponibilité de NMs de CeO₂ enrobés de citrate, appliquée de deux manières différentes au sol, pour le switchgrass (*Panicum virgatum*). Les NMs étaient soit directement appliqués au sol, ou préalablement appliqués sur des fragments de bois ensuite déposés sur le sol. Le système utilisé pour cette comparaison est le mésocosme. Il s'agit d'une caisse dans laquelle peuvent être installés différents milieux de culture : de l'eau, du sol ou une division entre une partie terrestre et une partie aquatique ([Colman et al., 2013](#); [Lowry et al., 2012a](#)). Les objectifs étaient de cultiver la même variété de switchgrass sur les deux types de sol contaminés, avec le RHIZOtest, et de comparer les résultats obtenus entre les deux échelles d'études. Un premier essai n'a pas abouti, à cause d'une contamination ayant détruit un lot trop important de plantes. Les sols ont été importés en France pour renouveler l'étude. De plus, lors de la campagne d'épandage de boue de station d'épuration, nous avons cherché à comparer les communautés microbiennes d'un sol avec une culture de choux, entre une culture en RHIZOtest et une culture en pot. Les résultats sont, à l'heure actuelle, en cours de traitement.

Il est donc envisageable d'inclure le RHIZOtest dans les FAs concernant les NMs. A terme, les différentes études en RHIZOtest pourront constituer un support à l'évaluation des risques liés au rejet dans l'environnement de différents NMs. Comme le souligne [Servin and White \(2016\)](#), si la grande majorité des études concernant les interactions entre les plantes et les NMs avec des concentrations d'exposition élevées, des temps d'exposition courts et dans des milieux cultures simplifiés était nécessaires, il est temps désormais de franchir une étape dans la méthodologie. Il est actuellement possible d'étudier en détails l'impact de différents facteurs environnementaux sur la phytodisponibilité des NMs, et d'établir des ponts avec des milieux d'étude de plus grande complexité et à une plus grande échelle. Nous ajoutons une pierre dans l'amélioration et la prévention des risques liés aux nanotechnologies, promises comme un puits d'innovations technologiques par Richard Smalley ([Smalley, 1996](#)), suite à ses travaux précurseurs sur les fullerènes.

Références

- Adam, V., Loyaux-Lawniczak, S., Labille, J., Galindo, C., del Nero, M., Gangloff, S., Weber, T., and Quaranta, G. (2016). Aggregation behaviour of TiO₂ nanoparticles in natural river water. *Journal of Nanoparticle Research* **18**, 13.
- Adams, L. K., Lyon, D. Y., and Alvarez, P. J. J. (2006). Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water Research* **40**, 3527-3532.
- Ahlberg, S., Antonopoulos, A., Diendorf, J., Dringen, R., Eppe, M., Flöck, R., Goedecke, W., Graf, C., Haberl, N., Helmlinger, J., Herzog, F., Heuer, F., Hirn, S., Johannes, C., Kittler, S., Köller, M., Korn, K., Kreyling, W. G., Krombach, F., Lademann, J., Loza, K., Luther, E. M., Malissek, M., Meinke, M. C., Nordmeyer, D., Paillart, A., Raabe, J., Rancan, F., Rothen-Rutishauser, B., Rühl, E., Schleh, C., Seibel, A., Sengstock, C., Treuel, L., Vogt, A., Weber, K., and Zellner, R. (2014). PVP-coated, negatively charged silver nanoparticles: A multi-center study of their physicochemical characteristics, cell culture and in vivo experiments. *Beilstein Journal of Nanotechnology* **5**, 1944-1965.
- Al-Kattan, A., Wichser, A., Zuin, S., Arroyo, Y., Golanski, L., Ulrich, A., and Nowack, B. (2014). Behavior of TiO₂ Released from Nano-TiO₂-Containing Paint and Comparison to Pristine Nano-TiO₂. *Environmental Science & Technology* **48**, 6710-6718.
- Allan, D. L., and Jarrell, W. M. (1989). Proton and Copper Adsorption to Maize and Soybean Root Cell Walls. *Plant Physiology* **89**, 823-832.
- Andersen, T. G., Barberon, M., and Geldner, N. (2015). Suberization - the second life of an endodermal cell. *Current Opinion in Plant Biology* **28**, 9-15.
- Anjum, N. A., Gill, S. S., Duarte, A. C., Pereira, E., and Ahmad, I. (2013). Silver nanoparticles in soil-plant systems. *Journal of Nanoparticle Research* **15**.
- Annamalai, M., Dhinesh, B., Nanthagopal, K., SivaramaKrishnan, P., Isaac JoshuaRamesh Lalvani, J., Parthasarathy, M., and Annamalai, K. (2016). An assessment on performance, combustion and emission behavior of a diesel engine powered by ceria nanoparticle blended emulsified biofuel. *Energy Conversion and Management* **123**, 372-380.
- Arnaud, C., Bonnot, C., Desnos, T., and Nussaume, L. (2010). The root cap at the forefront. *Comptes Rendus Biologies* **333**, 335-343.
- Atkinson, D., Black, K. E., Forbes, P. J., Hooker, J. E., Baddeley, J. A., and Watson, C. A. (2003). The influence of arbuscular mycorrhizal colonization and environment on root development in soil. *European Journal of Soil Science* **54**, 751-757.
- Auffan, M., Masion, A., Labille, J., Diot, M.-A., Liu, W., Olivi, L., Proux, O., Ziarelli, F., Chaurand, P., Geantet, C., Bottero, J.-Y., and Rose, J. (2014). Long-term aging of a CeO₂ based nanocomposite used for wood protection. *Environmental Pollution* **188**, 1-7.
- Auffan, M., Rose, J., Bottero, J. Y., Lowry, G. V., Jolivet, J. P., and Wiesner, M. R. (2009). Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nature Nanotechnology* **4**, 634-641.
- Baalousha, M. (2009). Aggregation and disaggregation of iron oxide nanoparticles: Influence of particle concentration, pH and natural organic matter. *Science of the Total Environment* **407**, 2093-2101.
- Baize, D., and Girard, M.-C. (2008). Référentiel pédologique. *AFES Quae Edition*, 405.
- Bandmann, V., Muller, J. D., Kohler, T., and Homann, U. (2012). Uptake of fluorescent nano beads into BY2-cells involves clathrin-dependent and clathrin-independent endocytosis. *Febs Letters* **586**, 3626-3632.
- Barberon, M., and Geldner, N. (2014). Radial Transport of Nutrients: The Plant Root as a Polarized Epithelium. *Plant Physiology* **166**, 528-537.
- Barnabas, A. D. (1991). *Thalassodendron ciliatum* (Forssk.) Den Hartog: root structure and histochemistry in relation to apoplastic transport. *Aquatic Botany* **40**, 129-143.

- Barth, M., and Holstein, S. E. H. (2004). Identification and functional characterization of Arabidopsis AP180, a binding partner of plant alpha C-adaptin. *Journal of Cell Science* **117**, 2051-2062.
- Barton, L. E., Auffan, M., Bertrand, M., Barakat, M., Santaella, C., Masion, A., Borschneck, D., Olivi, L., Roche, N., Wiesner, M. R., and Bottero, J. Y. (2014). Transformation of Pristine and Citrate-Functionalized CeO₂ Nanoparticles in a Laboratory-Scale Activated Sludge Reactor. *Environmental Science & Technology* **48**, 7289-7296.
- Basta, N. T., Ryan, J. A., and Chaney, R. L. (2005). Trace element chemistry in residual-treated soil: Key concepts and metal bioavailability. *Journal of Environmental Quality* **34**, 49-63.
- Batley, G. E., Halliburton, B., Kirby, J. K., Doolette, C. L., Navarro, D., McLaughlin, M. J., and Veitch, C. (2013). Characterization and ecological risk assessment of nanoparticulate CeO₂ as a diesel fuel catalyst. *Environmental Toxicology and Chemistry* **32**, 1896-1905.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. Roy. Statist. Soc. Ser.* **57**, 289-300.
- Benoit, R., Wilkinson, K. J., and Sauvé, S. (2013). Partitioning of silver and chemical speciation of free Ag in soils amended with nanoparticles. *Chemistry Central Journal* **7**, 75.
- Berg, K., Weyergang, A., Prasmickaite, L., Bonsted, A., Høgset, A., Strand, M.-T. R., Wagner, E., and Selbo, P. K. (2010). Photochemical Internalization (PCI): A Technology for Drug Delivery. In "Photodynamic Therapy: Methods and Protocols" (C. J. Gomer, ed.), pp. 133-145. Humana Press, Totowa, NJ.
- Blaser, S. A., Scheringer, M., MacLeod, M., and Hungerbühler, K. (2008). Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: Contribution of nano-functionalized plastics and textiles. *Science of the Total Environment* **390**, 396-409.
- Boxall, A. B. A., Chaudhry, Q., Sinclair, C., Jones, A., Aitken, R., Bruce, J., Jefferson, S., and Watts, C. (2007). Current and future predicted environmental exposure to engineered nanoparticles.
- Bravin, M. N., Marti, A. L., Clairotte, M., and Hinsinger, P. (2009). Rhizosphere alkalisation - a major driver of copper bioavailability over a broad pH range in an acidic, copper-contaminated soil. *Plant and Soil* **318**, 257-268.
- Bravin, M. N., Michaud, A. M., Larabi, B., and Hinsinger, P. (2010). RHIZOtest: A plant-based biotest to account for rhizosphere processes when assessing copper bioavailability. *Environmental Pollution* **158**, 3330-3337.
- Brown, I., Trethowan, J., Kerry, M., Mansfield, J., and Bolwell, G. P. (1998). Localization of components of the oxidative cross-linking of glycoproteins and of callose synthesis in papillae formed during the interaction between non-pathogenic strains of *Xanthomonas campestris* and French bean mesophyll cells. *The Plant Journal* **15**, 333-343.
- Burke, D. J., Zhu, S., Pablico-Lansigan, M. P., Hewins, C. R., and Samia, A. C. S. (2014). Titanium oxide nanoparticle effects on composition of soil microbial communities and plant performance. *Biology and Fertility of Soils* **50**, 1169-1173.
- Burklew, C. E., Ashlock, J., Winfrey, W. B., and Zhang, B. H. (2012). Effects of Aluminum Oxide Nanoparticles on the Growth, Development, and microRNA Expression of Tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Plos One* **7**.
- Bustamante, M., Robledo-Abad, C., Harper, R., Mbow, C., Ravindranat, N. H., Sperling, F., Haberl, H., de Siqueira Pinto, A., and Smith, P. (2014). Co-benefits, trade-offs, barriers and policies for greenhouse gas mitigation in the agriculture, forestry and other land use (AFOLU) sector. *Global Change Biology* **20**, 3270-3290.
- Caballero-Guzman, A., and Nowack, B. (2016). A critical review of engineered nanomaterial release data: Are current data useful for material flow modeling? *Environmental Pollution* **213**, 502-517.
- Carpita, N., Sabulase, D., Montezinos, D., and Delmer, D. P. (1979). Determination of the Pore Size of Cell Walls of Living Plant Cells. *Science* **205**, 1144-1147.

- Chaignon, V., Bedin, F., and Hinsinger, P. (2002). Copper bioavailability and rhizosphere pH changes as affected by nitrogen supply for tomato and oilseed rape cropped on an acidic and a calcareous soil. *Plant and Soil* **243**, 219-228.
- Chaignon, V., and Hinsinger, P. (2003). A biotest for evaluating copper bioavailability to plants in a contaminated soil. *Journal of Environmental Quality* **32**, 824-833.
- Chen, K. L., and Elimelech, M. (2007). Influence of humic acid on the aggregation kinetics of fullerene (C-60) nanoparticles in monovalent and divalent electrolyte solutions. *Journal of Colloid and Interface Science* **309**, 126-134.
- Chen, M., Xu, N., Cao, X. D., Zhou, K. R., Chen, Z. G., Wang, Y. L., and Liu, C. (2015). Facilitated transport of anatase titanium dioxides nanoparticles in the presence of phosphate in saturated sands. *Journal of Colloid and Interface Science* **451**, 134-143.
- Choat, B., Ball, M., Luly, J., and Holtum, J. (2003). Pit Membrane Porosity and Water Stress-Induced Cavitation in Four Co-Existing Dry Rainforest Tree Species. *Plant Physiology* **131**, 41-48.
- Chowdhury, I., Cwiertny, D. M., and Walker, S. L. (2012). Combined Factors Influencing the Aggregation and Deposition of nano-TiO₂ in the Presence of Humic Acid and Bacteria. *Environmental Science & Technology* **46**, 6968-6976.
- Colangelo, E. P., and Gueriot, M. L. (2006). Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 322-330.
- Colman, B. P., Arnaout, C. L., Anciaux, S., Gunsch, C. K., Hochella, M. F., Kim, B., Lowry, G. V., McGill, B. M., Reinsch, B. C., Richardson, C. J., Unrine, J. M., Wright, J. P., Yin, L. Y., and Bernhardt, E. S. (2013). Low Concentrations of Silver Nanoparticles in Biosolids Cause Adverse Ecosystem Responses under Realistic Field Scenario. *Plos One* **8**.
- Cornelis, G. (2015). Fate descriptors for engineered nanoparticles: the good, the bad, and the ugly. *Environmental Science-Nano* **2**, 19-26.
- Cornelis, G., Doolette, C., Thomas, M., McLaughlin, M. J., Kirby, J. K., Beak, D. G., and Chittleborough, D. (2012). Retention and Dissolution of Engineered Silver Nanoparticles in Natural Soils. *Soil Science Society of America Journal* **76**, 891-902.
- Cornelis, G., Hund-Rinke, K., Kuhlbusch, T., Van den Brink, N., and Nickel, C. (2014). Fate and Bioavailability of Engineered Nanoparticles in Soils: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **44**, 2720-2764.
- Cornelis, G., Pang, L., Doolette, C., Kirby, J. K., and McLaughlin, M. J. (2013). Transport of silver nanoparticles in saturated columns of natural soils. *Science of The Total Environment* **463-464**, 120-130.
- Cornelis, G., Ryan, B., McLaughlin, M. J., Kirby, J. K., Beak, D., and Chittleborough, D. (2011). Solubility and Batch Retention of CeO₂ Nanoparticles in Soils. *Environmental Science & Technology* **45**, 2777-2782.
- Cox, A., Venkatachalam, P., Sahi, S., and Sharma, N. (2016). Silver and titanium dioxide nanoparticle toxicity in plants: a review of current research. *Plant Physiology and Biochemistry* **107**, 147-163.
- Cumberland, S. A., and Lead, J. R. (2009). Particle size distributions of silver nanoparticles at environmentally relevant conditions. *Journal of Chromatography A* **1216**, 9099-9105.
- DalCorso, G., Manara, A., Piasentin, S., and Furini, A. (2014). Nutrient metal elements in plants. *Metallomics* **6**, 1770-1788.
- Daniel, M.-C., and Astruc, D. (2004). Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chemical Reviews* **104**, 293-346.
- Darlington, T. K., Neigh, A. M., Spencer, M. T., Nguyen, O. T., and Oldenburg, S. J. (2009). Nanoparticle Characteristics Affecting Environmental Fate and Transport through Soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* **28**, 1191-1199.
- De la Torre-Roche, R., Hawthorne, J., Deng, Y., Xing, B., Cai, W., Newman, L. A., Wang, Q., Ma, X., Hamdi, H., and White, J. C. (2014). Multiwalled carbon nanotubes and C60 fullerenes

- differentially impact the accumulation of weathered pesticides in four agricultural plants. *Environ. Sci. Technol.* **47**, 12539-12547.
- De La Torre-Roche, R., Hawthorne, J., Musante, C., Xing, B. S., Newman, L. A., Ma, X. M., and White, J. C. (2013). Impact of Ag Nanoparticle Exposure on p,p'-DDE Bioaccumulation by Cucurbita pepo (Zucchini) and Glycine max (Soybean). *Environmental Science & Technology* **47**, 718-725.
- Debnath, N., Das, S., Seth, D., Chandra, R., Bhattacharya, S. C., and Goswami, A. (2011). Entomotoxic effect of silica nanoparticles against Sitophilus oryzae (L.). *Journal of Pest Science* **84**, 99-105.
- Debosz, K., Petersen, S. O., Kure, L. K., and Ambus, P. (2002). Evaluating effects of sewage sludge and household compost on soil physical, chemical and microbiological properties. *Applied Soil Ecology* **19**, 237-248.
- Deiana, S., Gessa, C., Palma, A., Premoli, A., and Senette, C. (2003). Influence of organic acids exuded by plants on the interaction of copper with the polysaccharidic components of the root mucilages. *Organic Geochemistry* **34**, 651-660.
- Delay, M., Dolt, T., Woellhaf, A., Sembritzki, R., and Frimmel, F. H. (2011). Interactions and stability of silver nanoparticles in the aqueous phase: Influence of natural organic matter (NOM) and ionic strength. *Journal of Chromatography A* **1218**, 4206-4212.
- Dick, K., Dhanasekaran, T., Zhang, Z., and Meisel, D. (2002). Size-Dependent Melting of Silica-Encapsulated Gold Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **124**, 2312-2317.
- Dimkpa, C. O., Calder, A., Gajjar, P., Merugu, S., Huang, W., Britt, D. B., McLean, J. E., Johnson, W. P., and Anderson, A. J. (2011). Interaction of silver nanoparticles with an environmentally beneficial bacterium, Pseudomonas chlororaphis. *Journal of Hazardous Materials* **188**, 428-435.
- Dimkpa, C. O., Latta, D. E., McLean, J. E., Britt, D. W., Boyanov, M. I., and Anderson, A. J. (2013). Fate of CuO and ZnO Nano- and Microparticles in the Plant Environment. *Environmental Science & Technology* **47**, 4734-4742.
- Dolan, L. (2001). How and where to build a root hair. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 550-554.
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., and Scheres, B. (1993). Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. *Development* **119**, 71-84.
- Domingos, R. F., Tufenkji, N., and Wilkinson, K. J. (2009). Aggregation of Titanium Dioxide Nanoparticles: Role of a Fulvic Acid. *Environmental Science & Technology* **43**, 1282-1286.
- Doolette, C. L., McLaughlin, M. J., Kirby, J. K., and Navarro, D. A. (2015). Bioavailability of silver and silver sulfide nanoparticles to lettuce (Lactuca sativa): Effect of agricultural amendments on plant uptake. *Journal of Hazardous Materials* **300**, 788-795.
- Dordas, C., and Brown, P. H. (2001). Evidence for channel mediated transport of boric acid in squash (Cucurbita pepo). *Plant and Soil* **235**, 95-103.
- Dotaniya, M. L., and Meena, V. D. (2015). Rhizosphere effect on nutrient availability in soil and its uptake by plants: a review. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* **85**, 1-12.
- Dray, S., Dufour, A.-B., and Thioulouse, J. (2017). Analysis of Ecological Data : Exploratory and Euclidean Methods in Environmental Sciences. *R package Version* **1.7-6**.
- Dufey, J. E., Genon, J. G., Jaillard, B., Calba, H., Rufyikiri, G., and Delvaux, B. (2001). Cation exchange on plant roots involving aluminium : Experimental data and modeling. In "Trace elements in the rhizosphere" (W. W. W. E. L. G.R. Gobran, ed.), pp. 227-252. CRC Press, London, Royaume-Uni.
- Dufour, F., Pigeot-Remy, S., Durupthy, O., Cassaignon, S., Ruau, V., Torelli, S., Mariey, L., Maugé, F., and Chanéac, C. (2015). Morphological control of TiO₂ anatase nanoparticles: What is the good surface property to obtain efficient photocatalysts? *Applied Catalysis B: Environmental* **174-175**, 350-360.
- Dugassa, D. G., Grunewaldtstocker, G., and Schonbeck, F. (1995). Growth of Glomus-Intraradices and Its Effect on Linseed (Linum-Usitatissimum L) in Hydroponic Culture. *Mycorrhiza* **5**, 279-282.

- Duponnois, R., Diédhiou, S., Chotte, J. L., and Sy, M. O. (2003). Relative importance of the endomycorrhizal and (or) ectomycorrhizal associations in *Allocasuarina* and *Casuarina* genera. *Canadian Journal of Microbiology* **49**, 281-287.
- Dwivedi, A. D., Dubey, S. P., Sillanpaa, M., Kwon, Y. N., Lee, C., and Varma, R. S. (2015). Fate of engineered nanoparticles: Implications in the environment. *Coordination Chemistry Reviews* **287**, 64-78.
- Elimelech, M., Gregory, J., Jia, X., and Williams, R. (1995). Particle Deposition & Aggregation. *Butterworth Heinemann*.
- Epstein, E., Rains, D.W., and Elzam, O.E. (1963). Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Etcheberria, E., Gonzalez, P., Baroja-Fernandez, E., and Romero, J. P. (2006). Fluid Phase Endocytic Uptake of Artificial Nano-Spheres and Fluorescent Quantum Dots by Sycamore Cultured Cells: Evidence for the Distribution of Solutes to Different Intracellular Compartments. *Plant Signaling & Behavior* **1**, 196-200.
- European-Union (2011). RECOMMANDATION DE LA COMMISSION du 18 octobre 2011 relative à la définition des nanomatériaux. *Journal officiel de l'Union européenne*, 3.
- European Commission (2016). Definition of a nanomaterial.
- Fan, L., Li, R., Pan, J., Ding, Z., and Lin, J. (2015). Endocytosis and its regulation in plants. *Trends in Plant Science* **20**, 388-397.
- Feichtmeier, N. S., Walther, P., and Leopold, K. (2015). Uptake, effects, and regeneration of barley plants exposed to gold nanoparticles.
- Feng, Y., Cui, X., He, S., Dong, G., Chen, M., Wang, J., and Lin, X. (2013). The Role of Metal Nanoparticles in Influencing Arbuscular Mycorrhizal Fungi Effects on Plant Growth. *Environmental science & technology* **47**, 9496-9504.
- Fenoglio, I., Greco, G., Livraghi, S., and Fubini, B. (2009). Non-UV-Induced Radical Reactions at the Surface of TiO₂ Nanoparticles That May Trigger Toxic Responses. *Chemistry – A European Journal* **15**, 4614-4621.
- Fisher, D. B. (1999). The estimated pore diameter for plasmodesmal channels in the *Abutilon* nectary trichome should be about 4 nm, rather than 3 nm. *Planta* **208**, 299-300.
- Foltête, A.-S., Masfaraud, J.-F., Bigorgne, E., Nahmani, J., Chaurand, P., Botta, C., Labille, J., Rose, J., Féraud, J.-F., and Cotellet, S. (2011). Environmental impact of sunscreen nanomaterials: Ecotoxicity and genotoxicity of altered TiO₂ nanocomposites on *Vicia faba*. *Environmental Pollution* **159**, 2515-2522.
- Foss Hansen, S., Larsen, B. H., Olsen, S. I., and Baun, A. (2007). Categorization framework to aid hazard identification of nanomaterials. *Nanotoxicology* **1**, 243-250.
- Galway, M. E. G. E. (2006). Root hair cell walls: filling in the framework This review is one of a selection of papers published in the Special Issue on Plant Cell Biology. *Canadian Journal of Botany* **84**, 613-621.
- Geisler-Lee, J., Brooks, M., Gerfen, J. R., Wang, Q., Fotis, C., Sparer, A., Ma, X. M., Berg, R. H., and Geisler, M. (2014). Reproductive Toxicity and Life History Study of Silver Nanoparticle Effect, Uptake and Transport in *Arabidopsis thaliana*. *Nanomaterials* **4**, 301-318.
- Geisler-Lee, J., Wang, Q., Yao, Y., Zhang, W., Geisler, M., Li, K., Huang, Y., Chen, Y., Kolmakov, A., and Ma, X. (2012). Phytotoxicity, accumulation and transport of silver nanoparticles by *Arabidopsis thaliana*. *Nanotoxicology* **7**, 323-337.
- Geranio, L., Heuberger, M., and Nowack, B. (2009). The Behavior of Silver Nanotextiles during Washing. *Environmental Science & Technology* **43**, 8113-8118.
- Gerbeau, P., Amodeo, G., Henzler, T., Santoni, V., Ripoche, P., and Maurel, C. (2002). The water permeability of *Arabidopsis* plasma membrane is regulated by divalent cations and pH. *Plant Journal* **30**, 71-81.
- Gorman, J. (2002). Taming High-Tech Particle. Cautious steps into the nanotech future. *Science New*.

- Gottschalk, F., Lassen, C., Kjoelholm, J., Christensen, F., and Nowack, B. (2015). Modeling Flows and Concentrations of Nine Engineered Nanomaterials in the Danish Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **12**, 5581-5602.
- Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R. W., and Nowack, B. (2009). Modeled Environmental Concentrations of Engineered Nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for Different Regions. *Environmental Science & Technology* **43**, 9216-9222.
- Graça, J., and Santos, S. (2007). Suberin: A Biopolyester of Plants' Skin. *Macromolecular Bioscience* **7**, 128-135.
- Grillo, R., Rosa, A. H., and Fraceto, L. F. (2015). Engineered nanoparticles and organic matter: A review of the state-of-the-art. *Chemosphere* **119**, 608-619.
- Guan, H. N., Chi, D. F., Yu, J. C., and Li, X. (2008). A novel photodegradable insecticide: Preparation, characterization and properties evaluation of nano-imidacloprid. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **92**, 83-91.
- Guigues, S., Bravin, M., Garnier, C., Masion, A., and Doelsch, E. (2014). Isolated cell walls exhibit cation binding properties distinct from those of plant roots. *Plant and Soil* **381**, 367-379.
- Guo, Y., Cheng, C., Wang, J., Wang, Z., Jin, X., Li, K., Kang, P., and Gao, J. (2011). Detection of reactive oxygen species (ROS) generated by TiO₂(R), TiO₂(R/A) and TiO₂(A) under ultrasonic and solar light irradiation and application in degradation of organic dyes. *Journal of Hazardous Materials* **192**, 786-793.
- Guzman, K. A. D., Finnegan, M. P., and Banfield, J. F. (2006). Influence of surface potential on aggregation and transport of titania nanoparticles. *Environmental Science & Technology* **40**, 7688-7693.
- Hachez, C., Zelazny, E., and Chaumont, F. (2006). Modulating the expression of aquaporin genes in planta: A key to understand their physiological functions? *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1758**, 1142-1156.
- Haichar, F. e. Z., Marol, C., Berge, O., Rangel-Castro, J. I., Prosser, J. I., Balesdent, J., Heulin, T., and Achouak, W. (2008). Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *ISME J* **2**, 1221-1230.
- Haling, R. E., Brown, L. K., Bengough, A. G., Young, I. M., Hallett, P. D., White, P. J., and George, T. S. (2013). Root hairs improve root penetration, root-soil contact, and phosphorus acquisition in soils of different strength. *Journal of Experimental Botany* **64**.
- Harmsen, J. (2007). Measuring bioavailability: From a scientific approach to standard methods. *Journal of Environmental Quality* **36**, 1420-1428.
- Harmsen, J., Rulkens, W., and Eijssackers, H. J. P. (2005). Bioavailability: concept for understanding or tool predicting ? *Land Contamination & Reclamation*.
- Hauschild, M., Jeswiet, J., and Alting, L. (2005). From Life Cycle Assessment to sustainable production: Status and perspectives. *Cirp Annals-Manufacturing Technology* **54**, 535-554.
- Hazemann, J. L., Proux, O., Nassif, V., Palancher, H., Lahera, E., Da Silva, C., Braillard, A., Testemale, D., Diot, M. A., Alliot, I., Del Net, W., Manceau, A., Gelebart, F., Morand, M., Dermigny, Q., and Shukla, A. (2009). High-resolution spectroscopy on an X-ray absorption beamline. *Journal of Synchrotron Radiation* **16**, 283-292.
- Hendren, C. O., Lowry, G. V., Unrine, J. M., and Wiesner, M. R. (2015). A functional assay-based strategy for nanomaterial risk forecasting. *Science of the Total Environment* **536**, 1029-1037.
- Hernandez-Viezcas, J. A., Castillo-Michel, H., Andrews, J. C., Cotte, M., Rico, C., Peralta-Videa, J. R., Ge, Y., Priester, J. H., Holden, P. A., and Gardea-Torresdey, J. L. (2013). In Situ Synchrotron X-ray Fluorescence Mapping and Speciation of CeO₂ and ZnO Nanoparticles in Soil Cultivated Soybean (*Glycine max*). *ACS Nano*.
- Herrmann, J. M., Duchamp, C., Karkmaz, M., Hoai, B. T., Lachheb, H., Puzenat, E., and Guillard, C. (2007). Environmental green chemistry as defined by photocatalysis. *Journal of Hazardous Materials* **146**, 624-629.
- Hinsinger, P., Bengough, A. G., Vetterlein, D., and Young, I. (2009). Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil* **321**, 117-152.

- Hinsinger, P., Plassard, C., Tang, C. X., and Jaillard, B. (2003). Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant and Soil* **248**, 43-59.
- Hodomihou, N. R., Feder, F., Masse, D., Agbossou, K. E., Amadji, G. L., Ndour-Badiane, Y., and Doelsch, E. (2016). Diagnosis of periurban Dakar (Senegal) agrosystem contamination by trace elements. *Biotechnologie Agronomie Societe Et Environnement* **20**, 397-407.
- Holden, P. A., Klaessig, F., Turco, R. F., Priester, J. H., Rico, C. M., Avila-Arias, H., Mortimer, M., Pacpaco, K., and Gardea-Torresdey, J. L. (2014). Evaluation of Exposure Concentrations Used in Assessing Manufactured Nanomaterial Environmental Hazards: Are They Relevant? *Environmental Science & Technology* **48**, 10541-10551.
- Hong, J., Peralta-Videa, J. R., Rico, C., Sahi, S., Viveros, M. N., Bartonjo, J., Zhao, L. J., and Gardea-Torresdey, J. L. (2014). Evidence of Trans location and Physiological Impacts of Foliar Applied CeO₂ Nanoparticles on Cucumber (*Cucumis sativus*) Plants. *Environmental Science & Technology* **48**, 4376-4385.
- Horst, W. J., Wagner, A., and Marschner, H. (1982). Mucilage Protects Root Meristems from Aluminium Injury. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **105**, 435-444.
- Hossain, Z., Mustafa, G., and Komatsu, S. (2015). Plant Responses to Nanoparticle Stress. *International Journal of Molecular Sciences* **16**, 26644-26653.
- Hu, Y., Li, J., Ma, L., Peng, Q. L., Feng, W., Zhang, L., He, S. B., Yang, F., Huang, J., and Li, L. J. (2010). High efficiency transport of quantum dots into plant roots with the aid of silwet L-77. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**, 703-709.
- Hubert, R., Gert, R., Ana, B. S., Hendrik, E., Neil, G., Robert, K., Thomas, L., Kirsten, R., Juan, R. S., Birgit, S.-K., and Hermann, S. (2015). Towards a review of the EC Recommendation for a definition of the term "nanomaterial" Part 3: Scientific-technical evaluation of options to clarify the definition and to facilitate its implementation. *JRC Science for policy report*.
- ISO-11074-1 (2004). Soil quality - Vocabulary - Part 1: Terms and definitions relating to the protection and pollution of the soil. *ISO*.
- ISO-16198 (2015). Soil quality - Plant-based test to assess the environmental bioavailability of trace elements to plants.
- ISO 2006 Soil quality - Guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability in soil and soil materials. *ISO/DIS 17402*.
- ISO 16198 (2015). Plant-based test to assess the environmental bioavailability of trace elements to plants *In "Soil quality"*, Geneva, Switzerland.
- ISO 17402 (2008). Guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability of contaminants in soil and soil materials. *In "Soil quality"*, Geneva, Switzerland.
- Iversen, T. G., Skotland, T., and Sandvig, K. (2011). Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. *Nano Today* **6**, 176-185.
- Jacob, D. L., Borchardt, J. D., Navaratnam, L., Otte, M. L., and Bezbaruah, A. N. (2013). Uptake and Translocation of Ti from Nanoparticles in Crops and Wetland Plants. *International Journal of Phytoremediation* **15**, 142-153.
- Jarbeau, J. A., Ewers, F. W., and Davis, S. D. (1995). The mechanism of water-stress-induced embolism in two species of chaparral shrubs. *Plant, Cell & Environment* **18**, 189-196.
- Jarvis, S. C., and Robson, A. D. (1983). The effects of nitrogen nutrition of plants on the development of acidity in western Australian soils. II. Effects of differences in cation/anion balance between plant species grown under non-leaching conditions. *Australian Journal of Agricultural Research* **34**, 355-365.
- Jiang, J., Oberdörster, G., and Biswas, P. (2009). Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research* **11**, 77-89.

- Johnson, A. C., and Park, B. (2012). Predicting contamination by the fuel additive cerium oxide engineered nanoparticles within the United Kingdom and the associated risks. *Environmental Toxicology and Chemistry* **31**, 2582-2587.
- Jones, E. H., and Su, C. M. (2012). Fate and transport of elemental copper (Cu-0) nanoparticles through saturated porous media in the presence of organic materials. *Water Research* **46**, 2445-2456.
- Judy, J. D., and Bertsch, P. M. (2014). Bioavailability, Toxicity, and Fate of Manufactured Nanomaterials in Terrestrial Ecosystems. *Advances in Agronomy, Vol 123* **123**, 1-64.
- Judy, J. D., Unrine, J. M., Rao, W., Wirick, S., and Bertsch, P. M. (2012). Bioavailability of Gold Nanomaterials to Plants: Importance of Particle Size and Surface Coating. *Environmental Science & Technology* **46**, 8467-8474.
- Jungk, A. (2001). Root hairs and the acquisition of plant nutrients from soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **164**, 121-129.
- Kabata-Pendias, A. (2000). Trace Elements in Plants. In "Trace Elements in Soils and Plants, Third Edition". CRC Press.
- Kah, M. (2015). Nanopesticides and Nanofertilizers: Emerging Contaminants or Opportunities for Risk Mitigation? *Frontiers in Chemistry* **3**.
- Kah, M., Beulke, S., Tiede, K., and Hofmann, T. (2013). Nanopesticides: State of Knowledge, Environmental Fate, and Exposure Modeling. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **43**, 1823-1867.
- Kah, M., and Hofmann, T. (2014). Nanopesticide research: Current trends and future priorities. *Environment International* **63**, 224-235.
- Keegstra, K. (2010). Plant Cell Walls. *Plant Physiology* **154**, 483-486.
- Keller, A. A., and Lazareva, A. (2014). Predicted Releases of Engineered Nanomaterials: From Global to Regional to Local. *Environmental Science & Technology Letters* **1**, 65-70.
- Keller, A. A., McFerran, S., Lazareva, A., and Suh, S. (2013). Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *Journal of Nanoparticle Research* **15**.
- Khanna, A. S. (2008). Nanotechnology in High Performance Paint Coatings. *Asian J. Exp. Sci* **21**.
- Khot, L. R., Sankaran, S., Maja, J. M., Ehsani, R., and Schuster, E. W. (2012). Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: A review. *Crop Protection* **35**, 64-70.
- Kim, B., Murayama, M., Colman, B. P., and Hochella, M. F. (2012). Characterization and environmental implications of nano- and larger TiO₂ particles in sewage sludge, and soils amended with sewage sludge. *Journal of Environmental Monitoring* **14**, 1129-1137.
- Kim, J. H., Lee, Y., Kim, E. J., Gu, S., Sohn, E. J., Seo, Y. S., An, H. J., and Chang, Y. S. (2014). Exposure of Iron Nanoparticles to Arabidopsis thaliana Enhances Root Elongation by Triggering Cell Wall Loosening. *Environmental Science & Technology* **48**, 3477-3485.
- Kim, R.-Y., Yoon, J.-K., Kim, T.-S., Yang, J. E., Owens, G., and Kim, K.-R. (2015). Bioavailability of heavy metals in soils: definitions and practical implementation—a critical review. *Environmental Geochemistry and Health* **37**, 1041-1061.
- Kolattukudy, P. E. (1981). Structure, Biosynthesis, and Biodegradation of Cutin and Suberin. *Annual Review of Plant Physiology* **32**, 539-567.
- Kookana, R. S., Boxall, A. B. A., Reeves, P. T., Ashauer, R., Beulke, S., Chaudhry, Q., Cornelis, G., Fernandes, T. F., Gan, J., Kah, M., Lynch, I., Ranville, J., Sinclair, C., Spurgeon, D., Tiede, K., and Van den Brink, P. J. (2014). Nanopesticides: Guiding Principles for Regulatory Evaluation of Environmental Risks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**, 4227-4240.
- Kosmulski, M. (2003). A literature survey of the differences between the reported isoelectric points and their discussion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **222**, 113-118.
- Kosmulski, M. (2009). pH-dependent surface charging and points of zero charge. IV. Update and new approach. *Journal of Colloid and Interface Science* **337**, 439-448.

- Kurepa, J., Paunesku, T., Vogt, S., Arora, H., Rabatic, B. M., Lu, J. J., Wanzer, M. B., Woloschak, G. E., and Smalle, J. A. (2010). Uptake and Distribution of Ultrasmall Anatase TiO₂ Alizarin Red S Nanoconjugates in *Arabidopsis thaliana*. *Nano Letters* **10**, 2296-2302.
- Labille, J., Harns, C., Bottero, J.-Y., and Brant, J. (2015). Heteroaggregation of titanium dioxide nanoparticles with natural clay colloids. *Environmental Science & Technology* **49**, 6608-6616.
- Lacerda, L., Soundararajan, A., Singh, R., Pastorin, G., Al-Jamal, K. T., Turton, J., Frederik, P., Herrero, M. A., Li, S., Bao, A., Emfietzoglou, D., Mather, S., Phillips, W. T., Prato, M., Bianco, A., Goins, B., and Kostarelos, K. (2008). Dynamic Imaging of Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotube Systemic Circulation and Urinary Excretion. *Advanced Materials* **20**, 225-230.
- Lai, S. L., Guo, J. Y., Petrova, V., Ramanath, G., and Allen, L. H. (1996). Size-Dependent Melting Properties of Small Tin Particles: Nanocalorimetric Measurements. *Physical Review Letters* **77**.
- Lam, C.-W., James, J. T., McCluskey, R., and Hunter, R. L. (2004). Pulmonary Toxicity of Single-Wall Carbon Nanotubes in Mice 7 and 90 Days After Intratracheal Instillation. *Toxicological Sciences* **77**, 126-134.
- Lanno, R., Wells, J., Conder, J., Bradham, K., and Basta, N. (2004). The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **57**, 39-47.
- Larue, C., Castillo-Michel, H., Sobanska, S., Trcera, N., Sorieul, S., Cecillon, L., Ouerdane, L., Legros, S., and Sarret, G. (2014). Fate of pristine TiO₂ nanoparticles and aged paint-containing TiO₂ nanoparticles in lettuce crop after foliar exposure. *Journal of Hazardous Materials* **273**, 17-26.
- Larue, C., Laurette, J., Herlin-Boime, N., Khodja, H., Fayard, B., Flank, A. M., Brisset, F., and Carriere, M. (2012a). Accumulation, translocation and impact of TiO₂ nanoparticles in wheat (*Triticum aestivum* spp.): Influence of diameter and crystal phase. *Science of the Total Environment* **431**, 197-208.
- Larue, C., Veronesi, G., Flank, A. M., Surble, S., Herlin-Boime, N., and Carriere, M. (2012b). Comparative Uptake and Impact of TiO₂ Nanoparticles in Wheat and Rapeseed. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues* **75**, 722-734.
- Layet, C., Auffan, M., Santaella, C., Chevassus-Rosset, C., Montes, M., Ortet, P., Barakat, M., Collin, B., Legros, S., Bravin, M. N., Angeletti, B., Kieffer, I., Proux, O., Hazemann, J.-L., and Doelsch, E. (2017). Evidence that Soil Properties and Organic Coating Drive the Phytoavailability of Cerium Oxide Nanoparticles. *Environmental Science & Technology* **51**, 9756-9764.
- Lecoanet, H. F., Bottero, J. Y., and Wiesner, M. R. (2004). Laboratory assessment of the mobility of nanomaterials in porous media. *Environmental Science & Technology* **38**, 5164-5169.
- Lee, W. M., Kwak, J. I., and An, Y. J. (2012). Effect of silver nanoparticles in crop plants *Phaseolus radiatus* and *Sorghum bicolor*: Media effect on phytotoxicity. *Chemosphere* **86**, 491-499.
- Levard, C., Hotze, E. M., Lowry, G. V., and Brown, G. E. (2012). Environmental Transformations of Silver Nanoparticles: Impact on Stability and Toxicity. *Environmental Science & Technology* **46**, 6900-6914.
- Levard, C., Mitra, S., Yang, T., Jew, A. D., Badireddy, A. R., Lowry, G. V., and Brown, G. E. (2013). Effect of Chloride on the Dissolution Rate of Silver Nanoparticles and Toxicity to *E. coli*. *Environmental Science & Technology* **47**, 5738-5745.
- Li, H. Y., Ye, X. X., Guo, X. S., Geng, Z. G., and Wang, G. Z. (2016). Effects of surface ligands on the uptake and transport of gold nanoparticles in rice and tomato. *Journal of Hazardous Materials* **314**, 188-196.
- Lin, D., Story, S. D., Walker, S. L., Huang, Q., Liang, W., and Cai, P. (2017). Role of pH and ionic strength in the aggregation of TiO₂ nanoparticles in the presence of extracellular polymeric substances from *Bacillus subtilis*. *Environmental Pollution* **228**, 35-42.
- Lin, D., and Xing, B. (2008). Root Uptake and Phytotoxicity of ZnO Nanoparticles. *Environmental Science & Technology* **42**, 5580-5585.
- Liu, H. H., and Cohen, Y. (2014). Multimedia Environmental Distribution of Engineered Nanomaterials. *Environmental Science & Technology* **48**, 3281-3292.

- Llorens, I., Lahera, E., Delnet, W., Proux, O., Braillard, A., Hazemann, J. L., Prat, A., Testemale, D., Dermigny, Q., Gelebart, F., Morand, M., Shukla, A., Bardou, N., Ulrich, O., Arnaud, S., Berar, J. F., Boudet, N., Caillot, B., Chaurand, P., Rose, J., Doelsch, E., Martin, P., and Solari, P. L. (2012). High energy resolution five-crystal spectrometer for high quality fluorescence and absorption measurements on an x-ray absorption spectroscopy beamline. *Review of Scientific Instruments* **83**, 9.
- Lok, C.-N., Ho, C.-M., Chen, R., He, Q.-Y., Yu, W.-Y., Sun, H., Tam, P. K.-H., Chiu, J.-F., and Che, C.-M. (2006). Proteomic Analysis of the Mode of Antibacterial Action of Silver Nanoparticles. *Journal of Proteome Research* **5**, 916-924.
- Loosli, F., Le Coustumer, P., and Stoll, S. (2013). TiO₂ nanoparticles aggregation and disaggregation in presence of alginate and Suwannee River humic acids. pH and concentration effects on nanoparticle stability. *Water Research* **47**, 6052-6063.
- Lopez-Moreno, M. L., de la Rosa, G., Hernandez-Viezcás, J. A., Castillo-Michel, H., Botez, C. E., Peralta-Videa, J. R., and Gardea-Torresdey, J. L. (2010a). Evidence of the Differential Biotransformation and Genotoxicity of ZnO and CeO₂ Nanoparticles on Soybean (Glycine max) Plants. *Environmental Science & Technology* **44**, 7315-7320.
- Lopez-Moreno, M. L., de la Rosa, G., Hernandez-Viezcás, J. A., Peralta-Videa, J. R., and Gardea-Torresdey, J. L. (2010b). X-ray Absorption Spectroscopy (XAS) Corroboration of the Uptake and Storage of CeO₂ Nanoparticles and Assessment of Their Differential Toxicity in Four Edible Plant Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 3689-3693.
- Lowry, G. V., Espinasse, B. P., Badireddy, A. R., Richardson, C. J., Reinsch, B. C., Bryant, L. D., Bone, A. J., Deonaraine, A., Chae, S., Therezien, M., Colman, B. P., Hsu-Kim, H., Bernhardt, E. S., Matson, C. W., and Wiesner, M. R. (2012a). Long-Term Transformation and Fate of Manufactured Ag Nanoparticles in a Simulated Large Scale Freshwater Emergent Wetland. *Environmental Science & Technology* **46**, 7027-7036.
- Lowry, G. V., Gregory, K. B., Apte, S. C., and Lead, J. R. (2012b). Transformations of Nanomaterials in the Environment. *Environmental Science & Technology* **46**, 6893-6899.
- Lu, P.-J., Huang, S.-C., Chen, Y.-P., Chiueh, L.-C., and Shih, D. Y.-C. (2015). Analysis of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in cosmetics. *Journal of Food and Drug Analysis* **23**, 587-594.
- Lucas, W. J., and Wolf, S. (1993). Plasmodesmata: the intercellular organelles of green plants. *Trends in Cell Biology* **3**, 308-315.
- Luo, M., Huang, Y., Zhu, M., Tang, Y.-n., Ren, T., Ren, J., Wang, H., and Li, F. (2015). Properties of different natural organic matter influence the adsorption and aggregation behavior of TiO₂ nanoparticles. *Journal of Saudi Chemical Society*.
- Luo, P., Morrison, I., Dudkiewicz, A., Tiede, K., Boyes, E., O'Toole, P., Park, S., and Boxall, A. B. (2013). Visualization and characterization of engineered nanoparticles in complex environmental and food matrices using atmospheric scanning electron microscopy. *Journal of Microscopy* **250**, 32-41.
- Ma, R., Levard, C., Judy, J. D., Unrine, J. M., Durenkamp, M., Martin, B., Jefferson, B., and Lowry, G. V. (2014). Fate of Zinc Oxide and Silver Nanoparticles in a Pilot Wastewater Treatment Plant and in Processed Biosolids. *Environmental Science & Technology* **48**, 104-112.
- Ma, R., Levard, C., Marinakos, S. M., Cheng, Y. W., Liu, J., Michel, F. M., Brown, G. E., and Lowry, G. V. (2012). Size-Controlled Dissolution of Organic-Coated Silver Nanoparticles. *Environmental Science & Technology* **46**, 752-759.
- Ma, X., Geiser-Lee, J., Deng, Y. F., and Kolmakov, A. (2010). Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of The Total Environment* **408**, 3053-3061.
- Ma, Y., Zhang, P., Zhang, Z., He, X., Zhang, J., Ding, Y., Zhang, J., Zheng, L., Guo, Z., Zhang, L., Chai, Z., and Zhao, Y. (2015). Where Does the Transformation of Precipitated Ceria Nanoparticles in Hydroponic Plants Take Place? *Environmental Science & Technology* **49**, 10667-10674.
- Majumdar, S., Peralta-Videa, J. R., Trujillo-Reyes, J., Sun, Y. P., Barrios, A. C., Niu, G. H., Flores-Margez, J. P., and Gardea-Torresdey, J. L. (2016). Soil organic matter influences cerium translocation

- and physiological processes in kidney bean plants exposed to cerium oxide nanoparticles. *Science of the Total Environment* **569**, 201-211.
- Marcoux, M.-A., Matias, M., and Olivier, F. (2012). Substances émergentes, polluants émergents dans les déchets-Analyse et prospective. *Record*.
- Marschner, P., Yang, C. H., Lieberei, R., and Crowley, D. E. (2001). Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* **33**, 1437-1445.
- Marsh, M., and McMahon, H. T. (1999). Cell biology - The structural era of endocytosis. *Science* **285**, 215-220.
- Martell, A. E., and Smith, R. M. (1977). "Critical stability constants V.3.," Plenum Press, New York.
- Massard-Guilbaud, G. (2010). Histoire de la pollution industrielle. France, 1789-1914. *Éditions de l'EHESS*, 404.
- Maynard, A. D., Baron, P. A., Foley, M., Shvedova, A. A., Kisin, E. R., and Castranova, V. (2004). Exposure to Carbon Nanotube Material: Aerosol Release During the Handling of Unrefined Single-Walled Carbon Nanotube Material. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* **67**, 87-107.
- Mayor, S., and Pagano, R. E. (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 603-612.
- Mccann, M. C., Wells, B., and Roberts, K. (1990). Direct Visualization of Cross-Links in the Primary Plant-Cell Wall. *Journal of Cell Science* **96**, 323-334.
- McKee, M. S., and Filser, J. (2016). Impacts of metal-based engineered nanomaterials on soil communities. *Environmental Science-Nano* **3**, 506-533.
- Meesters, J. A. J., Quik, J. T. K., Koelmans, A. A., Hendriks, A. J., and van de Meent, D. (2016). Multimedia environmental fate and speciation of engineered nanoparticles: a probabilistic modeling approach. *Environmental Science-Nano* **3**, 715-727.
- Meier, C., Voegelin, A., Pradas del Real, A., Sarret, G., Mueller, C. R., and Kaegi, R. (2016). Transformation of silver nanoparticles in sewage sludge during incineration. *Environmental science & technology* **50**, 3503-3510.
- Meuser, H. (2010). Contaminated Urban Soils. *Springer*.
- Minchin, P. E. H., and Lacoite, A. (2005). New understanding on phloem physiology and possible consequences for modelling long-distance carbon transport. *New Phytologist* **166**, 771-779.
- Mitrano, D. M., Motellier, S., Clavaguera, S., and Nowack, B. (2015). Review of nanomaterial aging and transformations through the life cycle of nano-enhanced products. *Environment International* **77**, 132-147.
- Morose, G. (2010). The 5 principles of "Design for Safer Nanotechnology". *Journal of Cleaner Production* **18**, 285-289.
- Morrissey, J., and Gueriot, M. L. (2009). Iron uptake and transport in plants: The good, the bad, and the ionome. *Chemical reviews* **109**, 4553-4567.
- Moscatelli, A., Ciampolini, F., Rodighiero, S., Onelli, E., Cresti, M., Santo, N., and Idilli, A. (2007). Distinct endocytic pathways identified in tobacco pollen tubes using charged nanogold. *Journal of Cell Science* **120**, 3804-3819.
- Mukherjee, A., Peralta-Video, J. R., Bandyopadhyay, S., Rico, C. M., Zhao, L., and Gardea-Torresdey, J. L. (2014). Physiological effects of nanoparticulate ZnO in green peas (*Pisum sativum* L.) cultivated in soil. *Metallomics* **6**, 132-138.
- Navarro, D. A., Kirby, J. K., McLaughlin, M. J., Waddington, L., and Kookana, R. S. (2014). Remobilisation of silver and silver sulphide nanoparticles in soils. *Environmental Pollution* **193**, 102-110.
- Navarro, E., Piccapietra, F., Wagner, B., Marconi, F., Kaegi, R., Odzak, N., Sigg, L., and Behra, R. (2008). Toxicity of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science & Technology* **42**, 8959-8964.
- Nolan, A. L., Zhang, H., and McLaughlin, M. J. (2005). Prediction of Zinc, Cadmium, Lead, and Copper Availability to Wheat in Contaminated Soils Using Chemical Speciation, Diffusive Gradients in

- Thin Films, Extraction, and Isotopic Dilution Techniques. *Journal of Environmental Quality* **34**, 496-507.
- Oberdörster, E. (2004). Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environmental health perspectives*.
- Oburger, E., Dell'mour, M., Hann, S., Wieshammer, G., Puschenreiter, M., and Wenzel, W. W. (2013). Evaluation of a novel tool for sampling root exudates from soil-grown plants compared to conventional techniques. *Environmental and Experimental Botany* **87**, 235-247.
- Oburger, E., Gruber, B., Schindlegger, Y., Schenkeveld, W. D. C., Hann, S., Kraemer, S. M., Wenzel, W. W., and Puschenreiter, M. (2014). Root exudation of phytosiderophores from soil-grown wheat. *New Phytologist* **203**, 1161-1174.
- Oksanen, J. F., Blanchet, G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Henry, M. H. S., Szoecs, E., and Wagner, H. (2013). vegan: Community Ecology Package. *R package Version* **2.4-3**.
- Omar, F. M., Aziz, H. A., and Stoll, S. (2014). Aggregation and disaggregation of ZnO nanoparticles: Influence of pH and adsorption of Suwannee River humic acid. *Science of the Total Environment* **468**, 195-201.
- Onelli, E., Prescianotto-Baschong, C., Caccianiga, M., and Moscatelli, A. (2008). Clathrin-dependent and independent endocytic pathways in tobacco protoplasts revealed by labelling with charged nanogold. *Journal of Experimental Botany* **59**, 3051-3068.
- Palmer, C. M., and Guerinot, M. L. (2009). Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nat Chem Biol* **5**, 333-340.
- Park, B., Donaldson, K., Duffin, R., Tran, L., Kelly, F., Mudway, I., Morin, J.-P., Guest, R., Jenkinson, P., Samaras, Z., Giannouli, M., Kouridis, H., and Martin, P. (2008). Hazard and Risk Assessment of a Nanoparticulate Cerium Oxide-Based Diesel Fuel Additive—A Case Study. *Inhalation Toxicology* **20**, 547-566.
- Peijnenburg, W. J. G. M., Posthuma, L., Eijssackers, H. J. P., and Allen, H. E. (1997). A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **37**, 163-172.
- Peterson, C. A., and Cholewa, E. (1998). Structural modifications of the apoplast and their potential impact on ion uptake. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* **161**.
- Pii, Y., Borruso, L., Brusetti, L., Crecchio, C., Cesco, S., and Mimmo, T. (2016). The interaction between iron nutrition, plant species and soil type shapes the rhizosphere microbiome. *Plant Physiology and Biochemistry* **99**, 39-48.
- Plakhova, T. V., Romanchuk, A. Y., Yakunin, S. N., Dumas, T., Demir, S., Wang, S. A., Minasian, S. G., Shuh, D. K., Tyłiszczak, T., Shiryayev, A. A., Egorov, A. V., Ivanov, V. K., and Kalmykov, S. N. (2016). Solubility of Nanocrystalline Cerium Dioxide: Experimental Data and Thermodynamic Modeling. *Journal of Physical Chemistry C* **120**, 22615-22626.
- Poborilova, Z., Opatrilova, R., and Babula, P. (2013). Toxicity of aluminium oxide nanoparticles demonstrated using a BY-2 plant cell suspension culture model *Environmental and experimental botany* **91**, 1-11.
- Pokhrel, L. R., and Dubey, B. (2013). Evaluation of developmental responses of two crop plants exposed to silver and zinc oxide nanoparticles. *Science of the Total Environment* **452**, 321-332.
- Pradas del Real, A. E., Castillo-Michel, H., Kaegi, R., Sinnet, B., Magnin, V., Findling, N., Villanova, J., Carrière, M., Santaella, C., Fernández-Martínez, A., Levard, C., and Sarret, G. (2016). Fate of Ag-NPs in Sewage Sludge after Application on Agricultural Soils. *Environmental Science & Technology* **50**, 1759-1768.
- Pradas del Real, A. E., Vidal, V., Carrière, M., Castillo-Michel, H., Levard, C., Chaurand, P., and Sarret, G. (2017). Silver Nanoparticles and Wheat Roots: A Complex Interplay. *Environmental Science & Technology* **51**, 5774-5782.
- Priester, J. H., Ge, Y., Mielke, R. E., Horst, A. M., Moritz, S. C., Espinosa, K., Gelb, J., Walker, S. L., Nisbet, R. M., An, Y.-J., Schimel, J. P., Palmer, R. G., Hernandez-Viezcas, J. A., Zhao, L., Gardea-

- Torresdey, J. L., and Holden, P. A. (2012). Soybean susceptibility to manufactured nanomaterials with evidence for food quality and soil fertility interruption. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, E2451–E2456.
- Proux, O., Lahera, E., Del Net, W., Kieffer, I., Rovezzi, M., Testemale, D., Irar, M., Thomas, S., Aguilar-Tapia, A., Bazarkina, E. F., Prat, A., Tella, M., Auffan, M., Rose, J., and Hazemann, J.-L. (2017). High-Energy Resolution Fluorescence Detected X-Ray Absorption Spectroscopy: A Powerful New Structural Tool in Environmental Biogeochemistry Sciences. *Journal of Environmental Quality*.
- Pulit-Prociak, J., and Banach, M. (2016). Silver nanoparticles – a material of the future...? In "Open Chemistry", Vol. 14, pp. 76.
- Puschenreiter, M., Gruber, B., Wenzel, W. W., Schindlegger, Y., Hann, S., Spangl, B., Schenkeveld, W. D. C., Kraemer, S. M., and Oburger, E. (2017). Phytosiderophore-induced mobilization and uptake of Cd, Cu, Fe, Ni, Pb and Zn by wheat plants grown on metal-enriched soils. *Environmental and Experimental Botany* **138**, 67-76.
- Quevedo, I. R., and Tufenkji, N. (2012). Mobility of Functionalized Quantum Dots and a Model Polystyrene Nanoparticle in Saturated Quartz Sand and Loamy Sand. *Environmental Science & Technology* **46**, 4449-4457.
- Quik, J. T. K., Lynch, I., Van Hoecke, K., Miermans, C. J. H., De Schamphelaere, K. A. C., Janssen, C. R., Dawson, K. A., Stuart, M. A. C., and Van de Meent, D. (2010). Effect of natural organic matter on cerium dioxide nanoparticles settling in model fresh water. *Chemosphere* **81**, 711-715.
- Raliya, R., Nair, R., Chavalmane, S., Wang, W. N., and Biswas, P. (2015). Mechanistic evaluation of translocation and physiological impact of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles on the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plant. *Metallomics* **7**, 1584-1594.
- Ramesh, R., Kavitha, P., Kanipandian, N., Arun, S., Thirumurugan, R., and Subramanian, P. (2013). Alteration of antioxidant enzymes and impairment of DNA in the SiO₂ nanoparticles exposed zebra fish (*Danio rerio*). *Environmental Monitoring and Assessment* **185**, 5873-5881.
- Ravel, B., and Newville, M. (2005). ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. *Journal of Synchrotron Radiation* **12**, 537-541.
- Remédios, C., Rosário, F., and Bastos, V. (2012). Environmental Nanoparticles Interactions with Plants: Morphological, Physiological, and Genotoxic Aspects. *Journal of Botany* **2012**, 8.
- Ringner, M. (2008). What is principal component analysis? *Nat Biotech* **26**, 303-304.
- Roberts, A. G., and Oparka, K. J. (2003). Plasmodesmata and the control of symplastic transport. *Plant Cell and Environment* **26**, 103-124.
- Rougier, M. (1981). Secretory Activity of the Root Cap. In "Plant Carbohydrates II: Extracellular Carbohydrates" (W. Tanner and F. A. Loewus, eds.), pp. 542-574. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Sagee, O., Dror, I., and Berkowitz, B. (2012). Transport of silver nanoparticles (AgNPs) in soil. *Chemosphere* **88**, 670-675.
- Saini, P., Saha, S. K., Roy, P., Chowdhury, P., and Babu, S. P. S. (2016). Evidence of reactive oxygen species (ROS) mediated apoptosis in *Setaria cervi* induced by green silver nanoparticles from *Acacia auriculiformis* at a very low dose. *Experimental Parasitology* **160**, 39-48.
- Saito, R., Dresselhaus, G., and Dresselhaus, M. (1998). Physical Properties of Carbon Nanotubes.
- Scheringer, M. (2008). Nanoecotoxicology: Environmental risks of nanomaterials. *Nat Nano* **3**, 322-323.
- Schlich, K., Hoppe, M., Kraas, M., Fries, E., and Hund-Rinke, K. (2017). Ecotoxicity and fate of a silver nanomaterial in an outdoor lysimeter study. *Ecotoxicology* **26**, 738-751.
- Schoonderbeek, D., and Schoute, J. F. T. (1994). Root and Root-Soil Contact of Winter-Wheat in Relation to Soil Macroporosity. *Agriculture Ecosystems & Environment* **51**, 89-98.
- Schulz, A. (1995). Plasmodesmal Widening Accompanies the Short-Term Increase in Symplasmic Phloem Unloading in Pea Root-Tips under Osmotic-Stress. *Protoplasma* **188**, 22-37.

- Schwab, F., Zhai, G., Kern, M., Turner, A., Schnoor, J. L., and Wiesner, M. R. (2015). Barriers, pathways and processes for uptake, translocation and accumulation of nanomaterials in plants – Critical review. *Nanotoxicology* **10**, 257-278.
- Schwab, F., Zhai, G., Kern, M., Turner, A., Schnoor, J. L., and Wiesner, M. R. (2016). Barriers, pathways and processes for uptake, translocation and accumulation of nanomaterials in plants – Critical review. *Nanotoxicology* **10**, 257-278.
- Schwabe, F., Schulin, R., Limbach, L. K., Stark, W., Burge, D., and Nowack, B. (2013). Influence of two types of organic matter on interaction of CeO₂ nanoparticles with plants in hydroponic culture. *Chemosphere* **91**, 512-520.
- Schwabe, F., Tanner, S., Schulin, R., Rotzetter, A., Stark, W., von Quadt, A., and Nowack, B. (2015). Dissolved cerium contributes to uptake of Ce in the presence of differently sized CeO₂-nanoparticles by three crop plants. *Metallomics* **7**, 466-477.
- Sekine, R., Brunetti, G., Donner, E., Khaksar, M., Vasilev, K., Jamting, Å. K., and Lombi, E. (2014). Speciation and lability of Ag-, AgCl-, and Ag₂S-nanoparticles in soil determined by X-ray absorption spectroscopy and diffusive gradients in thin films. *Environmental science & technology* **49**, 897-905.
- Şerban, P., Wilson, J. R. U., Vamosi, J. C., and Richardson, D. M. (2008). Plant Diversity in the Human Diet: Weak Phylogenetic Signal Indicates Breadth. *Bioscience*.
- Servin, A. D., Castillo-Michel, H., Hernandez-Viezcas, J. A., Diaz, B. C., Peralta-Videa, J. R., and Gardea-Torresdey, J. L. (2012). Synchrotron Micro-XRE and Micro-XANES Confirmation of the Uptake and Translocation of TiO₂ Nanoparticles in Cucumber (*Cucumis sativus*) Plants. *Environmental Science & Technology* **46**, 7637-7643.
- Servin, A. D., and White, J. C. (2016). Nanotechnology in agriculture: Next steps for understanding engineered nanoparticle exposure and risk. *NanoImpact* **1**, 9-12.
- Shane, M. W., M C Cully, M. E., and Canny, M. J. (2000). Architecture of Branch-root Junctions in Maize: Structure of the Connecting Xylem and the Porosity of Pit Membranes. *Annals of Botany* **85**, 613-624.
- Shi, H. B., Magaye, R., Castranova, V., and Zhao, J. S. (2013). Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and Fibre Toxicology* **10**.
- Shor, L. M., and Kosson, D. S. (2000). Bioavailability of Organic Contaminants in Soils. In "Bioremediation" (J. J. Valdes, ed.), pp. 15-43. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Sigg, L., Xue, H. B., Kistler, D., and Sshonenberger, R. (2000). Size fractionation (dissolved, colloidal and particulate) of trace metals in the Thur River, Switzerland. *Aquatic Geochemistry* **6**, 413-434.
- Singh Sahu, Y. (2016). Nanomaterials Market. *Allied Market Research*.
- Smalley, R. E. (1996). Discovering the fullerenes, Nobel Lecture.
- Smith, P., House, J. I., Bustamante, M., Sobocká, J., Harper, R., Pan, G., West, P. C., Clark, J. M., Adhya, T., Rumpel, C., Paustian, K., Kuikman, P., Cotrufo, M. F., Elliott, J. A., McDowell, R., Griffiths, R. I., Asakawa, S., Bondeau, A., Jain, A. K., Meersmans, J., and Pugh, T. A. M. (2016). Global change pressures on soils from land use and management. *Global Change Biology* **22**, 1008-1028.
- Solovitch, N., Labille, J., Rose, J., Chaurand, P., Borschneck, D., Wiesner, M. R., and Bottero, J. Y. (2010). Concurrent Aggregation and Deposition of TiO₂ Nanoparticles in a Sandy Porous Media. *Environmental Science & Technology* **44**, 4897-4902.
- Somssich, M., Khan, G. A., and Persson, S. (2016). Cell Wall Heterogeneity in Root Development of *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- Soorash, A., Kwon, H., Taylor, R., Pietrantonio, P., Pine, M., and Sayes, C. M. (2011). Surface Functionalization of Silver Nanoparticles: Novel Applications for Insect Vector Control. *ACS Applied Materials & Interfaces* **3**, 3779-3787.
- Stampoulis, D., Sinha, S. K., and White, J. C. (2009). Assay-Dependent Phytotoxicity of Nanoparticles to Plants. *Environmental Science & Technology* **43**, 9473-9479.

- Stegemeier, J. P., Schwab, F., Colman, B. P., Webb, S. M., Newville, M., Lanzirotti, A., Winkler, C., Wiesner, M. R., and Lowry, G. V. (2015). Speciation Matters: Bioavailability of Silver and Silver Sulfide Nanoparticles to Alfalfa (*Medicago sativa*). *Environmental Science & Technology* **49**, 8451-8460.
- Stepniewski, W., Horn, R., and Martyniuk, S. (2002). Managing soil biophysical properties for environmental protection. *Agriculture Ecosystems & Environment* **88**, 175-181.
- Stumm, W. (1977). Chemical Interactions in Particle Separation. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **173**, 28-28.
- Stumm, W., and Morgan, J. (1996). Aquatic chemistry: chemical equilibria and rates in natural waters. *Wiley interscience*.
- Sugimoto, T., Zhou, X., and Muramatsu, A. (2003). Synthesis of uniform anatase TiO₂ nanoparticles by gel-sol method: 4. Shape control. *Journal of Colloid and Interface Science* **259**, 53-61.
- Sun, P. D., Shijirbaatar, A., Fang, J., Owens, G., Lin, D. H., and Zhang, K. K. (2015). Distinguishable Transport Behavior of Zinc Oxide Nanoparticles in Silica Sand and Soil Columns. *Science of the Total Environment* **505**, 189-198.
- Sun, T. Y., Bornhoft, N. A., Hungerbuhler, K., and Nowack, B. (2016). Dynamic Probabilistic Modeling of Environmental Emissions of Engineered Nanomaterials. *Environmental Science & Technology* **50**, 4701-4711.
- Sun, T. Y., Gottschalk, F., Hungerbuhler, K., and Nowack, B. (2014). Comprehensive probabilistic modelling of environmental emissions of engineered nanomaterials. *Environmental Pollution* **185**, 69-76.
- Suriyaprabha, R., Karunakaran, G., Yuvakkumar, R., Rajendran, V., and Kannan, N. (2012). Silica Nanoparticles for Increased Silica Availability in Maize (*Zea mays*. L) Seeds Under Hydroponic Conditions. *Current Nanoscience* **8**, 902-908.
- Team, R. D. C. (2011). R: A Language and Environment for Statistical Computing. (t. R. F. f. S. Computing, ed.), Vienna, Austria.
- Tella, M., Auffan, M., Brousset, L., Issartel, J., Kieffer, I., Pailles, C., Morel, E., Santaella, C., Angeletti, B., Artells, E., Rose, J., Thiery, A., and Bottero, J.-Y. (2014). Transfer, Transformation, and Impacts of Ceria Nanomaterials in Aquatic Mesocosms Simulating a Pond Ecosystem. *Environmental Science & Technology* **48**, 9004-9013.
- Tella, M., Auffan, M., Brousset, L., Morel, E., Proux, O., Chaneac, C., Angeletti, B., Pailles, C., Artells, E., Santaella, C., Rose, J., Thiery, A., and Bottero, J. Y. (2015). Chronic dosing of a simulated pond ecosystem in indoor aquatic mesocosms: fate and transport of CeO₂ nanoparticles. *Environmental Science-Nano* **2**, 653-663.
- Tepfer, M., and Taylor, I. E. P. (1981). The Permeability of Plant-Cell Walls as Measured by Gel-Filtration Chromatography. *Science* **213**, 761-763.
- Thioulouse, J., and Dray, S. (2007). Interactive multivariate data analysis in R with the ade4 and ade4TkGUI packages. *Journal of Statistical Software* **22**, 1-14.
- Thorsheim, P. (2006). Inventing Pollution: Coal, Smoke, and Culture in Britain since 1800. *Ohio University Press*.
- Tremel-Schaub, A., and Feix, I. (2005). Contamination des sols :
Transferts des sols vers les plantes. *ADEME*.
- Ulrich, A., and Wichser, A. (2003). Analysis of additive metals in fuel and emission aerosols of diesel vehicles with and without particle traps. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **377**, 71-81.
- V. Arul Mozhi Selvan, R. B. Anand, and dayakumar, M. U. (2009). Effects of Cerium oxide nanoparticle addition in diesel-biodiesel-ethanol blends on the performance and emission characteristics of a CI engine. *Journal of Engineering and Applied Sciences*.
- Vance, M. E., Kuiken, T., Vejerano, E. P., McGinnis, S. P., Hochella, M. F., Rejeski, D., and Hull, M. S. (2015). Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology* **6**, 1769-1780.

- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., and Boerjan, W. (2010). Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiology* **153**, 895-905.
- Wang, D., Jaisi, D. P., Yan, J., Jin, Y., and Zhou, D. (2015a). Transport and Retention of Polyvinylpyrrolidone-Coated Silver Nanoparticles in Natural Soils. *Vadose Zone Journal* **14**.
- Wang, D., Su, C., Zhang, W., Hao, X., Cang, L., Wang, Y., and Zhou, D. (2014). Laboratory assessment of the mobility of water-dispersed engineered nanoparticles in a red soil (Ultisol). *Journal of Hydrology* **519**, 1677-1687.
- Wang, H., Dong, Y.-n., Zhu, M., Li, X., Keller, A. A., Wang, T., and Li, F. (2015b). Heteroaggregation of engineered nanoparticles and kaolin clays in aqueous environments. *Water Research* **80**, 130-138.
- Wang, H. H., Kou, X. M., Pei, Z. G., Xiao, J. Q., Shan, X. Q., and Xing, B. S. (2011a). Physiological effects of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles on perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and pumpkin (*Cucurbita mixta*) plants. *Nanotoxicology* **5**, 30-42.
- Wang, J., Koo, Y., Alexander, A., Yang, Y., Westerhof, S., Zhang, Q. B., Schnoor, J. L., Colvin, V. L., Braam, J., and Alvarez, P. J. J. (2013a). Phytostimulation of Poplars and Arabidopsis Exposed to Silver Nanoparticles and Ag⁺ at Sublethal Concentrations. *Environmental Science & Technology* **47**, 5442-5449.
- Wang, P., Lombi, E., Zhao, F.-J., and Kopittke, P. M. (2016). Nanotechnology: A New Opportunity in Plant Sciences. *Trends in Plant Science* **21**, 699-712.
- Wang, Q., Ebbs, S. D., Chen, Y. S., and Ma, X. M. (2013b). Trans-generational impact of cerium oxide nanoparticles on tomato plants. *Metallomics* **5**, 753-759.
- Wang, S. H., Kurepa, J., and Smalle, J. A. (2011b). Ultra-small TiO₂ nanoparticles disrupt microtubular networks in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell and Environment* **34**, 811-820.
- Whitley, A. R., Levard, C., Oostveen, E., Bertsch, P. M., Matocha, C. J., von der Kammer, F., and Unrine, J. M. (2013). Behavior of Ag nanoparticles in soil: Effects of particle surface coating, aging and sewage sludge amendment. *Environmental Pollution* **182**, 141-149.
- Wiesner, M. R., and Bottero, J.-Y. (2016). Environmental Nanotechnology: Applications and Impacts of Nanomaterials, Second Edition. *Mc Graw Hill Education*.
- Yang, H., Knapp, J., Koirala, P., Rajagopal, D., Peer, W. A., Silbart, L. K., Murphy, A., and Gaxiola, R. A. (2007). Enhanced phosphorus nutrition in monocots and dicots over-expressing a phosphorus-responsive type I H⁺-pyrophosphatase. *Plant biotechnology journal* **5**, 735-745.
- Yang, X. P., Pan, H. P., Wang, P., and Zhao, F. J. (2017). Particle-specific toxicity and bioavailability of cerium oxide (CeO₂) nanoparticles to Arabidopsis thaliana. *Journal of Hazardous Materials* **322**, 292-300.
- Yang, Y., Wang, Y. F., Westerhoff, P., Hristovski, K., Jin, V. L., Johnson, M. V. V., and Arnold, J. G. (2014). Metal and nanoparticle occurrence in biosolid-amended soils. *Science of the Total Environment* **485**, 441-449.
- Yedra, Á., Gutiérrez-Somavilla, G., Manteca-Martínez, C., González-Barriuso, M., and Soriano, L. (2016). Conductive paints development through nanotechnology. *Progress in Organic Coatings* **95**, 85-90.
- Zabludowska, E., Kowalska, J., Jedynak, L., Wojas, S., Sklodowska, A., and Antosiewicz, D. M. (2009). Search for a plant for phytoremediation - What can we learn from field and hydroponic studies? *Chemosphere* **77**, 301-307.
- Zavaliev, R., Ueki, S., Epel, B. L., and Citovsky, V. (2011). Biology of callose (beta-1,3-glucan) turnover at plasmodesmata. *Protoplasma* **248**, 117-130.
- Zhai, G., Walters, K. S., Peate, D. W., Alvarez, P. J. J., and Schnoor, J. L. (2014). Transport of gold nanoparticles through plasmodesmata and precipitation of gold ions in woody poplar. *Environmental science & technology letters* **1**.
- Zhang, J., Nazarenko, Y., Zhang, L., Calderon, L., Lee, K.-B., Garfunkel, E., Schwander, S., Tetley, T. D., Chung, K. F., Porter, A. E., Ryan, M., Kipen, H., Liroy, P. J., and Mainelis, G. (2013). Impacts of a Nanosized Ceria Additive on Diesel Engine Emissions of Particulate and Gaseous Pollutants. *Environmental Science & Technology* **47**, 13077-13085.

- Zhang, P., Ma, Y. H., Zhang, Z. Y., He, X., Zhang, J., Guo, Z., Tai, R. Z., Zhao, Y. L., and Chai, Z. F. (2012). Biotransformation of Ceria Nanoparticles in Cucumber Plants. *Acs Nano* **6**, 9943-9950.
- Zhang, W., Musante, C., White, J. C., Schwab, P., Wang, Q., Ebbs, S. D., and Ma, X. (2017). Bioavailability of cerium oxide nanoparticles to *Raphanus sativus* L. in two soils. *Plant Physiology and Biochemistry* **110**, 185-193.
- Zhang, Z. Y., He, X., Zhang, H. F., Ma, Y. H., Zhang, P., Ding, Y. Y., and Zhao, Y. L. (2011). Uptake and distribution of ceria nanoparticles in cucumber plants. *Metallomics* **3**, 816-822.
- Zhao, L. J., Peralta-Videa, J. R., Varela-Ramirez, A., Castillo-Michel, H., Li, C. Q., Zhang, J. Y., Aguilera, R. J., Keller, A. A., and Gardea-Torresdey, J. L. (2012). Effect of surface coating and organic matter on the uptake of CeO₂ NPs by corn plants grown in soil: Insight into the uptake mechanism. *Journal of Hazardous Materials* **225**, 131-138.
- Zhou, D., Abdel-Fattah, A. I., and Keller, A. A. (2012a). Clay particles destabilize engineered nanoparticles in aqueous environments. *Environmental science & technology* **46**, 7520-7526.
- Zhou, D. X., Abdel-Fattah, A. I., and Keller, A. A. (2012b). Clay Particles Destabilize Engineered Nanoparticles in Aqueous Environments. *Environmental Science & Technology* **46**, 7520-7526.
- Zhu, H., Han, J., Xiao, J. Q., and Jin, Y. (2008). Uptake, translocation, and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants. *Journal of Environmental Monitoring* **10**, 713-717.
- Zhu, Z. J., Wang, H. H., Yan, B., Zheng, H., Jiang, Y., Miranda, O. R., Rotello, V. M., Xing, B. S., and Vachet, R. W. (2012). Effect of Surface Charge on the Uptake and Distribution of Gold Nanoparticles in Four Plant Species. *Environmental Science & Technology* **46**, 12391-12398.

Annexe I

Protocole détaillé du RHIZOtest

L'outil central de nos travaux a été bien sûr le RHIZOtest.

Les graines ont été semées dans les dispositifs flottant dans une solution nutritive (Figure 1). La solution nutritive en phase de germination correspond à la composition suivante : CaCl_2 ($600 \mu\text{mol.L}^{-1}$) et H_3BO_3 ($2 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Les graines sont recouvertes d'un papier d'aluminium jusqu'à constat d'une germination.

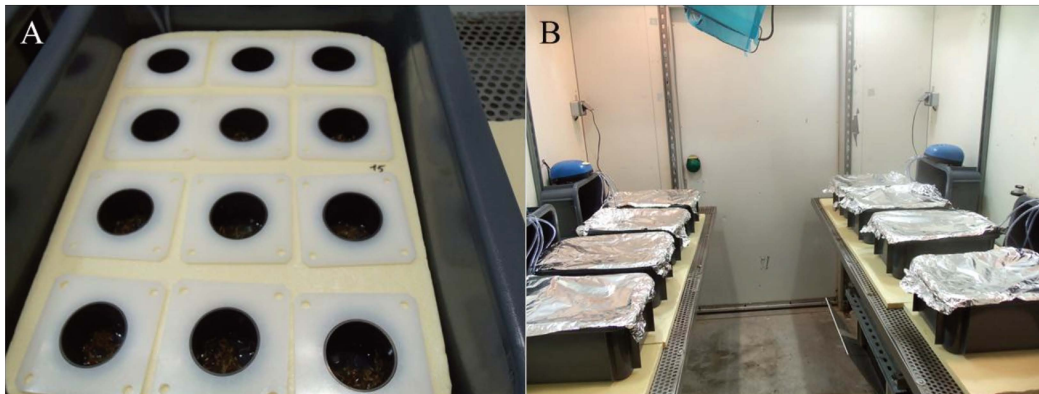


Figure 1: Mise en place du dispositif de germination en hydroponie. Les graines sont déposées dans chaque dispositif sur une plaque flottante sur la solution de germination (A). Les différents bacs sont disposés avec une oxygénation des solutions et recouverts d'un papier d'aluminium pour protéger les graines de la lumière (B).

Les solutions nutritives sont remplacées par une solution de croissance ayant la composition suivante : KH_2PO_4 ($500 \mu\text{mol.L}^{-1}$), KNO_3 ($2000 \mu\text{mol.L}^{-1}$), MnCl_2 ($2 \mu\text{mol.L}^{-1}$), Na_2MoO_4 ($0.05 \mu\text{mol.L}^{-1}$), MgSO_4 ($1000 \mu\text{mol.L}^{-1}$), H_3BO_3 ($10 \mu\text{mol.L}^{-1}$), ZnSO_4 ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$), CuCl_2 ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ($2000 \mu\text{mol.L}^{-1}$), et NaFe(III)EDTA (0.1 mol.L^{-1}).

La mise en contact entre le sol et la plante fait suite à cette période de croissance et dure sept jours. La masse de sol nécessaire pour le RHIZOtest est humidifiée au moment de la phase de croissance à 66% de la capacité maximale de rétention. La masse équivalente de sol sec utilisé dans le dispositif est pesée avant la mise en contact et correspond à 9.1g. Pour les différentes campagnes effectuées, les sols, une fois disposés, étaient contaminés par les différentes suspensions et solutions de NMs et d'éléments dissous correspondants, 45 minutes avant la mise en contact avec la plante et par la même personne. Le dispositif complet est illustré dans la Figure 2. La solution nutritive lors de la période de contact (8 jours) a la composition suivante : KH_2PO_4 ($500 \mu\text{mol.L}^{-1}$), KNO_3 ($2000 \mu\text{mol.L}^{-1}$), MgSO_4 (1000

$\mu\text{mol.L}^{-1}$), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ($2000 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Les réservoirs des dispositifs sont réalimentés en solution nutritive sont modifiés tous les trois jours.

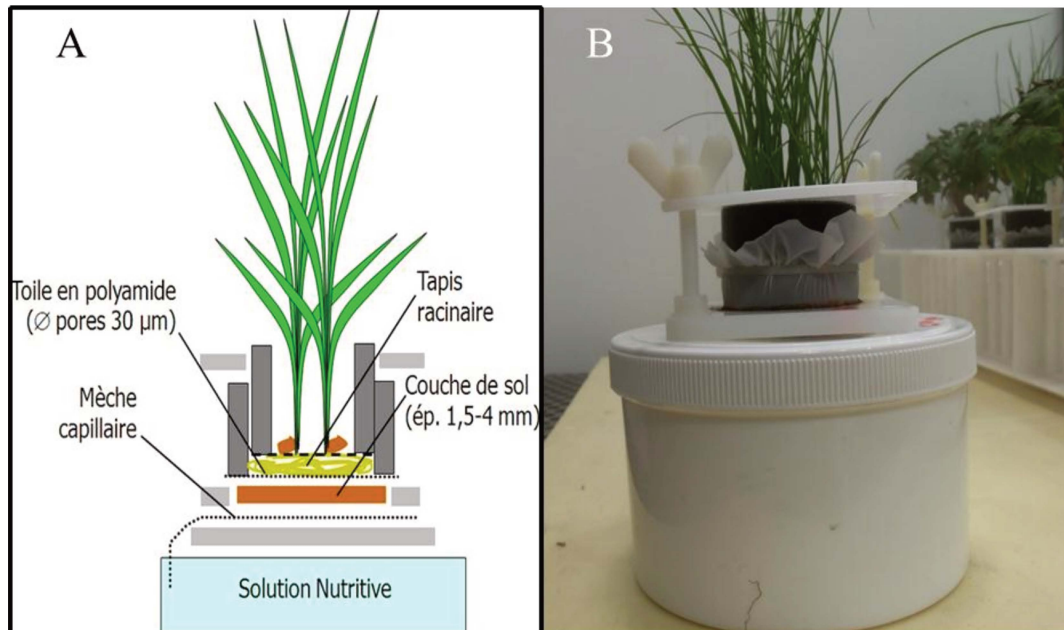


Figure 2: Dispositif complet du RHIZOtest. Les différentes parties sont précisées dans l'illustration (A), et image du dispositif réel (B)

La récolte des plantes se décompose en une extraction de la plante, une séparation des racines et des tiges, un séchage en étuve à 50°C , puis une pesée des différentes parties avant minéralisation. La minéralisation s'effectue dans des capsules de platine mises au four à 500°C pendant 2 heures. Les cendres sont humidifiées avec quelques gouttes d'eau ultra pure et 2 mL d'acide nitrique (6 mol.L^{-1}), et filtrées avec un papier filtre dans une fiole jaugée. Les filtres utilisés sont ensuite mis au four à 500°C pendant 30 minutes, dans les capsules respectives correspondant aux cendres ayant été utilisées. On ajoute ensuite 2 mL d'acide fluorhydrique dans les capsules qui sont mises sur plaque chauffante à 110°C pour évaporation. On ajoute enfin 2 mL d'eau ultra pure et 2 mL d'acide nitrique (6 mol.L^{-1}). Les solutions sont une dernière fois filtrées dans les mêmes fioles jaugées respectives, et le volume ajusté à 50 mL. Les solutions sont ensuite analysées en ICP-MS.

Annexe II Supporting Information

Evidence that soil properties and organic coating drive the phytoavailability of cerium oxide nanoparticles

Clément Layet^{1,2}, Mélanie Auffan^{1,2}, Catherine Santaella^{2,3}, Claire Chevassus-Rosset⁴, Mélanie Montes⁴, Philippe Ortet³, Mohamed Barakat³, Blanche Collin^{1,2}, Samuel Legros⁵, Matthieu N. Bravin⁶, Bernard Angeletti¹, Isabelle Kieffer⁷, Olivier Proux⁷, Jean-Louis Hazemann⁸, Emmanuel Doelsch^{4*}

(1) Aix Marseille Univ, CNRS, IRD, Coll de France, CEREGE UM34, 13545 Aix en Provence, France.

(2) iCEINT, International Center for the Environmental Implications of NanoTechnologies, CNRS - Duke university, Europôle de l'Arbois, 13545 Aix-en-Provence, France.

(3) Aix Marseille Univ, CEA, CNRS, UMR7265, LEMIRE, Laboratoire d'Ecologie Microbienne de la Rhizosphère et Environnement extrêmes, ECCOREV FR3098, F-13108 St Paul Les Durance, France (4) CIRAD, UPR Recyclage et risque, F-34398 Montpellier, France.

(5) CIRAD, UPR Recyclage et risque, 18524 Dakar, Senegal.

(6) CIRAD, UPR Recyclage et risque, F-97408, Saint-Denis, Réunion, France.

(7) OSUG, UMS 832 CNRS - Univ. Grenoble Alpes, F-38041 Grenoble, France

(8) Inst. Néel, UPR 2940 CNRS - Univ. Grenoble Alpes, F-38000 Grenoble, France

* Corresponding author: Emmanuel Doelsch doelsch@cirad.fr

Table S1. References and data used in the Figure 1

Table S2. Characteristics of the soils

Table S3. PERMANOVA on the whole set of data

Table S4. PERMANOVA on the set of data expunged from the control treatments (no Ce added)

Figure S1: The two-step procedure of RHIZOtest

Figure S2: Extracted cerium ($\mu\text{g.L}^{-1}$) in clay soil and sandy soil ($n=4$, \pm SD) under fescue

Figure S3. Hydrodynamic diameters of the bare and coated CeO_2 in soil solution extracted from fescue cultivated soils

Table S1. References and data used in the Figure 1.

*: significant difference with the control; NE: no difference with the control; NA=no statistical analysis

References	Plant	Growth medium	Exposure CeO ₂ concentrations (mg.L ⁻¹ or mg.kg ⁻¹)	CeO ₂ uptake compared with control plant
López-Moreno, M.L., de la Rosa, G., Hernández-Viezcas, J.A., Castillo-Michel, H., Botez, C.E., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., 2010. Evidence of the Differential Biotransformation and Genotoxicity of ZnO and CeO ₂ Nanoparticles on Soybean (Glycine max) Plants. Environmental Science & Technology 44, 7315-7320.	soybean	hydroponic	500	*
			1000	*
López-Moreno, M.L., de la Rosa, G., Hernández-Viezcas, J.A., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., 2010. X-ray Absorption Spectroscopy (XAS) Corroboration of the Uptake and Storage of CeO ₂ Nanoparticles and Assessment of Their Differential Toxicity in Four Edible Plant Species. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58, 3689-3693.	cucumber, tomato, corn, alfalfa	hydroponic	500	*
			1000	*
			2000	*
			4000	*
Garcia, A., Espinosa, R., Delgado, L., Casals, E., Gonzalez, E., Puentes, V., Barata, C., Font, X., Sanchez, A., 2011. Acute toxicity of cerium oxide, titanium oxide and iron oxide nanoparticles using standardized tests. Desalination 269, 136-141.	lettuce, cucumber, tomato, spinach	hydroponic	640	NA
Wang, Q., Ebbs, S.D., Chen, Y., Ma, X., 2013. Trans-generational impact of cerium oxide nanoparticles on tomato plants. Metallomics 5, 753-759.	tomato	hydroponic	0.1	NA
			1	NA
			10	*
Zhang, P., Ma, Y., Zhang, Z., He, X., Zhang, J., Guo, Z., Tai, R., Zhao, Y., Chai, Z., 2012. Biotransformation of Ceria Nanoparticles in Cucumber Plants. ACS Nano 6, 9943-9950.	cucumber	hydroponic	2000	*
Rico, C.M., Jie, H., Morales, M.I., Zhao, L.J., Barrios, A.C., Zhang, J.Y., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., 2013. Effect of cerium oxide nanoparticles on rice: a study involving the antioxidant defense system and in vivo fluorescence imaging. Environmental Science & Technology 47, 5635-5642.	rice	hydroponic	62.5	*
			125	*
			250	*
			500	*
Rico, C.M., Morales, M.I., McCreary, R., Castillo-Michel, H., Barrios, A.C., Hong, J., Tafuya, A., Lee, W.Y., Varela-Ramirez, A., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., 2013. Cerium oxide nanoparticles modify the antioxidative stress enzyme activities and macromolecule composition in rice seedlings. Environmental Science & Technology 47, 14110-14118.	rice	hydroponic	62,5	*
			125	*
			250	*
			500	*
Schwabe, F., Schulin, R., Limbach, L.K., Stark, W., Bürge, D., Nowack, B., 2013. Influence of two types of organic matter on interaction of CeO ₂ nanoparticles with plants in hydroponic culture. Chemosphere 91, 512-520.	Pumpkin, wheat	hydroponic	100	*
Trujillo-Reyes, J., Vilchis-Nestor, A.R., Majumdar, S., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., 2013. Citric acid modifies surface properties of commercial CeO ₂ nanoparticles reducing their toxicity and cerium uptake in radish (<i>Raphanus sativus</i>) seedlings. Journal of Hazardous Materials 263, 677-684.	radish	hydroponic	50	*
			100	*
			200	*
Ma, C., Chhikara, S., Xing, B., Musante, C., White, J.C., Dhankher, O.P., 2013. Physiological and Molecular Response of <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) to Nanoparticle Cerium and Indium Oxide Exposure. ACS Sustainable Chemistry & Engineering 1, 768-778.	<i>arabidopsis thaliana</i>	agar medium	250	NA
			500	NA
			1000	*
			2000	NA
Cui, D., Zhang, P., Ma, Y., He, X., Li, Y., Zhang, J., Zhao, Y., Zhang, Z., 2014. Effect of cerium oxide nanoparticles on asparagus lettuce cultured in an agar medium. Environmental Science-Nano 1, 459-465.	lettuce	agar medium	2	NA
			20	NA
			200	NA
			500	NA
			1000	NA

			2000	NA
Hong, J., Peralta-Videa, J.R., Rico, C., Sahi, S., Viveros, M.N., Bartonjo, J., Zhao, L., Gardea-Torresdey, J.L., 2014. Evidence of Translocation and Physiological Impacts of Foliar Applied CeO ₂ Nanoparticles on Cucumber (<i>Cucumis sativus</i>) Plants. Environmental Science & Technology 48, 4376-4385.	cucumber	hydroponic	20	*
			40	*
			80	*
			160	*
			320	*
Majumdar, S., Peralta-Videa, J., Bandyopadhyay, S., Castillo-Michel, H., Hernandez-Viezcás, J., Sahi, S., Gardea-Torresdey, J., 2014. Exposure of cerium oxide nanoparticles to kidney bean shows disturbance in the plant defense mechanisms. Journal of Hazardous Materials 278, 279-287.	kidney Bean	hydroponic	62.5	*
			125	*
			250	*
			500	*
Gómez-Garay, A., Pintos, B., Antonio Manzanera, J., Lobo, C., Villalobos, N., Martín, L., 2014. Uptake of CeO ₂ Nanoparticles and Its Effect on Growth of Medicago arborea In Vitro Plantlets. Biological Trace Element Research 161, 143-150.	<i>medicago arborea</i>	agar medium	100	NE
			200	NE
			400	*
Gui, X., He, X., Ma, Y., Zhang, P., Li, Y., Ding, Y., Yang, K., Li, H., Rui, Y., Chai, Z., Zhao, Y., Zhang, Z., 2015. Quantifying the distribution of ceria nanoparticles in cucumber roots: the influence of labeling. Rsc advances 5, 4554-4560.	cucumber	hydroponic	500	*
Ma, Y., Zhang, P., Zhang, Z., He, X., Li, Y., Zhang, J., Zheng, L., Chu, S., Yang, K., Zhao, Y., Chai, Z., 2015. Origin of the different phytotoxicity and biotransformation of cerium and lanthanum oxide nanoparticles in cucumber. Nanotoxicology 9, 262-270.	cucumber	hydroponic	0.2	*
			2	*
			20	*
			200	*
			2000	*
Ma, Y., Zhang, P., Zhang, Z., He, X., Zhang, J., Ding, Y., Zhang, J., Zheng, L., Guo, Z., Zhang, L., Chai, Z., Zhao, Y., 2015. Where Does the Transformation of Precipitated Ceria Nanoparticles in Hydroponic Plants Take Place? Environmental Science & Technology 49, 10667-10674.	cucumber	hydroponic	20	NA
			200	NA
			2000	NA
Mattiello, A., Filippi, A., Poscic, F., Musetti, R., Salvatici, M.C., Giordano, C., Vischi, M., Bertolini, A., Marchiol, L., 2015. Evidence of Phytotoxicity and Genotoxicity in <i>Hordeum vulgare</i> L. Exposed to CeO ₂ and TiO ₂ Nanoparticles. Frontiers in Plant Science 6.	barley	hydroponic	500	*
			1000	*
			2000	*
Rico, C.M., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., 2015. Differential Effects of Cerium Oxide Nanoparticles on Rice, Wheat, and Barley Roots: A Fourier Transform Infrared (FT-IR) Microspectroscopy Study. Applied spectroscopy 69, 287-295.	rice, barley, wheat	hydroponic	62.5	*
			125	*
			250	*
			500	*
Schwabe, F., Tanner, S., Schulin, R., Rotzetter, A., Stark, W., von Quadt, A., Nowack, B., 2015. Dissolved cerium contributes to uptake of Ce in the presence of differently sized CeO ₂ -nanoparticles by three crop plants. Metallomics 7, 466-477.	Pumpkin, wheat	hydroponic	100	*
Yang, Z., Chen, J., Dou, R., Gao, X., Mao, C., Wang, L., 2015. Assessment of the Phytotoxicity of Metal Oxide Nanoparticles on Two Crop Plants, Maize (<i>Zea mays</i> L.) and Rice (<i>Oryza sativa</i> L.). International Journal of Environmental Research and Public Health 12, 15100-15109.	maize, rice	hydroponic	2000	NA
Zhang, W., Ebbs, S.D., Musante, C., White, J.C., Gao, C., Ma, X., 2015. Uptake and Accumulation of Bulk and Nanosized Cerium Oxide Particles and Ionic Cerium by Radish (<i>Raphanus sativus</i> L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 63, 382-390.	radish	hydroponic	10	*
Andersen, C.P., King, G., Plocher, M., Storm, M., Pokhrel, L.R., Johnson, M.G., Rygielwicz, P.T., 2016. Germination and early plant development of ten species exposed to titanium dioxide and cerium oxide nanoparticles. Environmental Toxicology and Chemistry 35, 2223-2229.	lettuce, tomato, soybean, cabbage, carrot, perennial ryegrass, corn, cucumber, oat, onion	hydroponic	250	NA
			500	NA
			1000	NA
Dan, Y., Ma, X., Zhang, W., Liu, K., Stephan, C., Shi, H., 2016. Single particle ICP-MS method development for the determination of plant uptake and accumulation of CeO ₂ nanoparticles. Analytical and Bioanalytical Chemistry 408, 5157-5167.	tomato, pumpkin, soybean, cucumber	hydroponic	7	*

Mattiello, A., Poscic, F., Fellet, G., Zavalloni, C., Fontana, M., Piani, B., Vischi, M., Miceli, F., Musetti, R., Marchiol, L., 2016. Engineered nanomaterials and crops: Physiology and growth of barley as affected by nanoscale ceriumoxide. Italian Journal of Agronomy 11, 149-157.	barley	hydroponic	500	*
			1000	*
			2000	*
Ma, C., Liu, H., Guo, H., Musante, C., Coskun, S.H., Nelson, B.C., White, J.C., Xing, B., Dhankher, O.P., 2016. Defense mechanisms and nutrient displacement in Arabidopsis thaliana upon exposure to CeO ₂ and In ₂ O ₃ nanoparticles. Environmental Science-Nano 3, 1369-1379.	arabidopsis thaliana	agar medium	250	*
			1000	*
Yang, X., Pan, H., Wang, P., Zhao, F.-J., 2017. Particle-specific toxicity and bioavailability of ceriumoxide (CeO ₂) nanoparticles to Arabidopsis thaliana. Journal of Hazardous Materials 322, 292-300.	arabidopsis thaliana	agar medium	500	*
			1000	*
			1500	*
			2000	*
			2500	*
			3000	*

References	Plant	Growth medium	Exposure CeO ₂ concentrations (mg.kg ⁻¹)	CeO ₂ uptake compared with control plant
Ebbs, S.D., Bradfield, S.J., Kumar, P., White, J.C., Musante, C., Ma, X., 2016. Accumulation of zinc, copper, or cerium in carrot (Daucus carota) exposed to metal oxide nanoparticles and metal ions. Environmental	carrot	sand	0.5	*
			5	*
			50	*
			500	*
Rossi, L., Zhang, W., Lombardini, L., Ma, X., 2016. The impact of cerium oxide nanoparticles on the salt stress responses of <i>Brassica napus</i> L. Environmental Pollution 219, 28-36.	brassica napus L.	sand	200	*
			1000	*
Zhang, P., Ma, Y., Liu, S., Wang, G., Zhang, J., He, X., Zhang, J., Rui, Y., Zhang, Z., 2017. Phytotoxicity, uptake and transformation of nano-CeO ₂ in sand cultured romaine lettuce. Environmental Pollution 220, Part B, 1400-1408.	lettuce	sand	10	*
			100	*
			500	*
			2000	*

References	Plant	Growth medium	Exposure CeO ₂ concentrations (mg.L ⁻¹ or mg.kg ⁻¹)	CeO ₂ uptake compared with control plant
Birbaum, K., Brogioli, R., Schellenberg, M., Martinoia, E., Stark, W.J., Günther, D., Limbach, L.K., 2010. No Evidence for Cerium Dioxide Nanoparticle Translocation in Maize Plants. Environmental Science & Technology 44, 8718-8723.	maize	soil	40	NE
Wang, Q., Ma, X., Zhang, W., Pei, H., Chen, Y., 2012. The impact of cerium oxide nanoparticles on tomato (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) and its implications for food safety. Metallomics 4, 1105-1112.	tomato	soil	1.3	NE
			13	*
			130	*
Priester, J.H., Ge, Y., Mielke, R.E., Horst, A.M., Moritz, S.C., Espinosa, K., Gelb, J., Walker, S.L., Nisbet, R.M., An, Y.-J., Schimel, J.P., Palmer, R.G., Hernandez-Viezcas, J.A., Zhao, L., Gardea-Torresdey, J.L., Holden, P.A., 2012. Soybean susceptibility to manufactured nanomaterials with evidence for food quality and soil fertility interruption.	soybean	soil	100	*
			500	*
			1000	*

Proceedings of the National Academy of Sciences 109, E2451–E2456.				
Zhao, L., Peralta-Videa, J.R., Varela-Ramirez, A., Castillo-Michel, H., Li, C., Zhang, J., Aguilera, R.J., Keller, A.A., Gardea-Torresdey, J.L., 2012. Effect of surface coating and organic matter on the uptake of CeO ₂ NPs by corn plants grown in soil: Insight into the uptake mechanism. Journal of Hazardous Materials 225–226, 131–138.	maize	soil	100	*
			200	*
			400	*
			800	*
Morales, M.I., Rico, C.M., Hernandez-Viezcas, J.A., Nunez, J.E., Barrios, A.C., Taboia, A., Flores-Marges, J.P., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., 2013. Toxicity assessment of cerium oxide nanoparticles in cilantro (<i>Coriandrum sativum</i> L.) plants grown in organic soil. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61, 6224–6230.	cilantro	soil	62.5	NE
			125	*
			250	*
			500	*
Hernandez-Viezcas, J.A., Castillo-Michel, H., Andrews, J.C., Cotte, M., Rico, C., Peralta-Videa, J.R., Ge, Y., Priester, J.H., Holden, P.A., Gardea-Torresdey, J.L., 2013. In Situ Synchrotron X-ray Fluorescence Mapping and Speciation of CeO ₂ and ZnO Nanoparticles in Soil Cultivated Soybean (<i>Glycine max</i>). ACS Nano.	soybean	soil	500	*
			1000	*
Zhao, L.J., Sun, Y.P., Hernandez-Viezcas, J.A., Servin, A.D., Hong, J., Niu, G.H., Peralta-Videa, J.R., Duarte-Gardea, M., Gardea-Torresdey, J.L., 2013. Influence of CeO ₂ and ZnO nanoparticles on cucumber physiological markers and bioaccumulation of Ce and Zn: a life cycle study. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61, 11945–11951.	cucumber	soil	400	*
			800	*
Peralta-Videa, J., Hernandez-Viezcas, J., Zhao, L., Diaz, B., Ge, Y., Priester, J., Holden, P., Gardea-Torresdey, J., 2014. Cerium dioxide and zinc oxide nanoparticles alter the nutritional value of soil cultivated soybean plants. Plant physiology and biochemistry 80, 128–135.	soybean	soil	100	*
			500	*
			1000	*
Conway, J. R., Beaulieu, A. L., Beaulieu, N. L., Mazer, S. J., and Keller, A. A., 2015. Environmental Stresses Increase Photosynthetic Disruption by Metal Oxide Nanomaterials in a Soil-Grown Plant. Acs Nano 9, 11737–11749.	<i>clarkia unguiculata</i>	soil	23	*
			230	*
			2300	*
Xin, G., Zhiyong, Z., Shutong, L., Yuhui, M., Peng, Z., Xiao, H., Yuanyuan, L., Jing, Z., Huaifen, L., Yukui, R., Liming, L., Weidong, C., 2015. Fate and phytotoxicity of CeO ₂ nanoparticles on lettuce cultured in the potting soil environment. PLoS ONE 10.	lettuce	soil	50	*
			100	*
			1000	*
Rico, C.M., Barrios, A.C., Tan, W., Rubenecia, R., Lee, S.C., Varela-Ramirez, A., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., 2015. Physiological and biochemical response of soil-grown barley (<i>Hordeum vulgare</i> L.) to cerium oxide nanoparticles. Environmental Science and Pollution Research 22, 10551–10558.	barley	soil	125	*
			250	*
			500	*
Ma, X., Wang, Q., Rossi, L., Zhang, W., 2015. Cerium Oxide Nanoparticles and Bulk Cerium Oxide Leading to Different Physiological and Biochemical Responses in <i>Brassica rapa</i> . Environmental Science & Technology 50, 6793–6802. Majumdar, S., Almeida, I.C., Arigi, E.A., Choi, H., VerBerkmoes, N.C., Trujillo-Reyes, J., Flores-Margez, J.P., White, J.C., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., 2015. Environmental Effects of Nanoceria on Seed Production of Common Bean (<i>Phaseolus vulgaris</i>): A Proteomic Analysis. Environmental Science & Technology 49, 13283–13293.	<i>brassica rapa</i>	soil	32	NA
			320	NA
			62.5	*
	common bean	soil	125	NE
			250	*
			500	*
Majumdar, S., Peralta-Videa, J.R., Trujillo-Reyes, J., Sun, Y., Barrios, A.C., Niu, G., Margez, J.P.F., Gardea-Torresdey, J.L., 2016. Soil organic matter influences cerium translocation and physiological processes in kidney bean plants exposed to cerium oxide nanoparticles. Science of the Total Environment 569–570, 201–211.	kidney bean	soil	62.5	*
			125	*
			250	*
			500	*
Mattiello, A., Poscig, F., Fellet, G., Zavalloni, C., Fontana, M., Piani, B., Vischi, M., Miceli, F., Musetti, R., Marchiol, L., 2016. Engineered nanomaterials and crops: physiology and growth of barley as affected by nanoscale cerium oxide nanoscale cerium oxide. Italian Journal of Agronomy 11, 149–157.	barley	soil	500	*
			1000	*
Moll, J., Gogos, A., Bucheli, T.D., Widmer, F., van der Heijden, M.G.A., 2016. Effect of nanoparticles on red clover and its symbiotic microorganisms. Journal of Nanobiotechnology 14.	red clover	soil	860	NA

Poscic, F., Mattiello, A., Fellet, G., Miceli, F., Marchiol, L., 2016. Effects of Cerium and Titanium Oxide Nanoparticles in Soil on the Nutrient Composition of Barley (<i>Hordeum vulgare</i> L.) Kernels. International Journal of Environmental Research and Public Health 13.	barley	soil	500	NE
			1000	NE
Tassi, E., Giorgetti, L., Morelli, E., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., Barbaferi, M., 2016. Physiological and biochemical responses of sunflower (<i>Helianthus annuus</i> L.) exposed to nano-CeO ₂ and excess boron: Modulation of boron phytotoxicity. Plant physiology and biochemistry 110, 50-58.	sunflower	soil	100	*
			200	*
			400	*
			800	*
Zhang, W., Dan, Y., Shi, H., Ma, X., 2016. Effects of Aging on the Fate and Bioavailability of Cerium Oxide Nanoparticles to Radish (<i>Raphanus sativus</i> L.) in Soil. ACS Sustainable Chemistry & Engineering 4, 5424-5431.	radish	soil	1000	*
Barrios, A.C., Medina-Velo, I.A., Zuverza-Mena, N., Domínguez, O.E., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., 2017. Nutritional quality assessment of tomato fruits after exposure to uncoated and citric acid. Plant physiology and biochemistry 110, 100-107.	tomato	soil	62.5	*
			125	*
			250	*
			500	*
Bradfield, S.J., Pawan, K., White, J.C., Ebbs, S.D., 2017. Zinc, copper, or cerium accumulation from metal oxide nanoparticles or ions in sweet potato: yield effects and projected dietary intake from consumption. Plant physiology and biochemistry 110, 128-137.	sweet potato	soil	100	*
			500	*
			1000	*
Priester, J. H., Moritz, S. C., Espinosa, K., Ge, Y., Wang, Y., Nisbet, R. M., Schimel, J. P., Susana Goggi, A., Gardea-Torresdey, J. L., and Holden, P. A., 2017. Damage assessment for soybean cultivated in soil with either CeO ₂ or ZnO manufactured nanomaterials. Science of The Total Environment 579, 1756-1768.	soybean	soil	100	*
			500	*
			1000	*
Zhang, W., Musante, C., White, J.C., Schwab, P., Wang, Q., Ebbs, S.D., Ma, X., 2017. Bioavailability of cerium oxide nanoparticles to <i>Raphanus sativus</i> L. in two soils. Plant physiology and biochemistry 110, 185-193.	<i>raphanus sativus</i> L.	soil	100	*
			500	*
			1000	*

References	Exposure assessment	Predicted soil CeO ₂ concentration (mg.kg ⁻¹)
Park, B., Donaldson, K., Duffin, R., Tran, L., Kelly, F., Mudway, I., Morin, J.P., Guest, R., Jenkinson, P., Samaras, Z., Giannouli, M., Kouridis, H., Martin, P., 2008. Hazard and risk assessment of a nanoparticulate cerium oxide-based diesel fuel additive - A case study. Inhalation Toxicology 20, 547-566.	Soil contamination along a UK highway (26m and 96 m from the edge of the highway) assuming CeO ₂ accumulation over a 40-yr period	0.28-1.12
Johnson, A.C., Park, B., 2012. Predicting contamination by the fuel additive cerium oxide engineered nanoparticles within the United Kingdom and the associated risks. Environmental Toxicology and Chemistry 31, 2582-2587.	Soil contamination (restricted to 20m) along a UK road assuming constant deposition during 7 years and scenario of doubled use for 5 years	0.0021-0.039
Liu, H.H., Cohen, Y., 2014. Multimedia Environmental Distribution of Engineered Nanomaterials. Environmental Science & Technology 48, 3281-3292.	Soil contamination by accumulation in the Los Angeles region over a 1-yr period	0.000072
Gottschalk, F., Lassen, C., Koelholm, J., Christensen, F., Nowack, B., 2015. Modeling Flows and Concentrations of Nine Engineered Nanomaterials in the Danish Environment. International Journal of Environmental Research and Public Health 12, 5581-5602.	Soil contamination by accumulation over a 14-yr period in Denmark	0.00001-0.0051
Meesters, J.A.J., Quik, J.T.K., Koelmans, A.A., Hendriks, A.J., van de Meent, D., 2016. Multimedia environmental fate and speciation of engineered nanoparticles: a probabilistic modeling approach. Environmental Science Nano 3, 715-727.	Soil contamination on a regional scale in the EU	Median value: 0.5 (0.003-100: 95% confidence intervals)

Table S2. Characteristics of the soils.

	pH _{water}	Clay %	Fine silt %	Coarse silt %	Fine sand %	Coarse sand %	CEC cmol.kg ⁻¹	C _{org} %	N _{total} ‰	DOC µg L ⁻¹	[Ce] mg.kg ⁻¹
Sandy soil (0-20 cm)	8.6±0.3	1.6±1.9	0.3±0.1	8.1±0.9	34.4±3.2	55±24	2.1±0.2	0.51±0.1	0.01±0.1	8.6±1.3	5.6±0.6
Clay soil (0-20 cm)	6.2±0.3	47.9±2.8	28.5±3.8	7.2±0.9	9.6±0.8	6.8±0.6	21±2	3.7±0.2	3.5±0.3	1.7±0.4	103±0.4

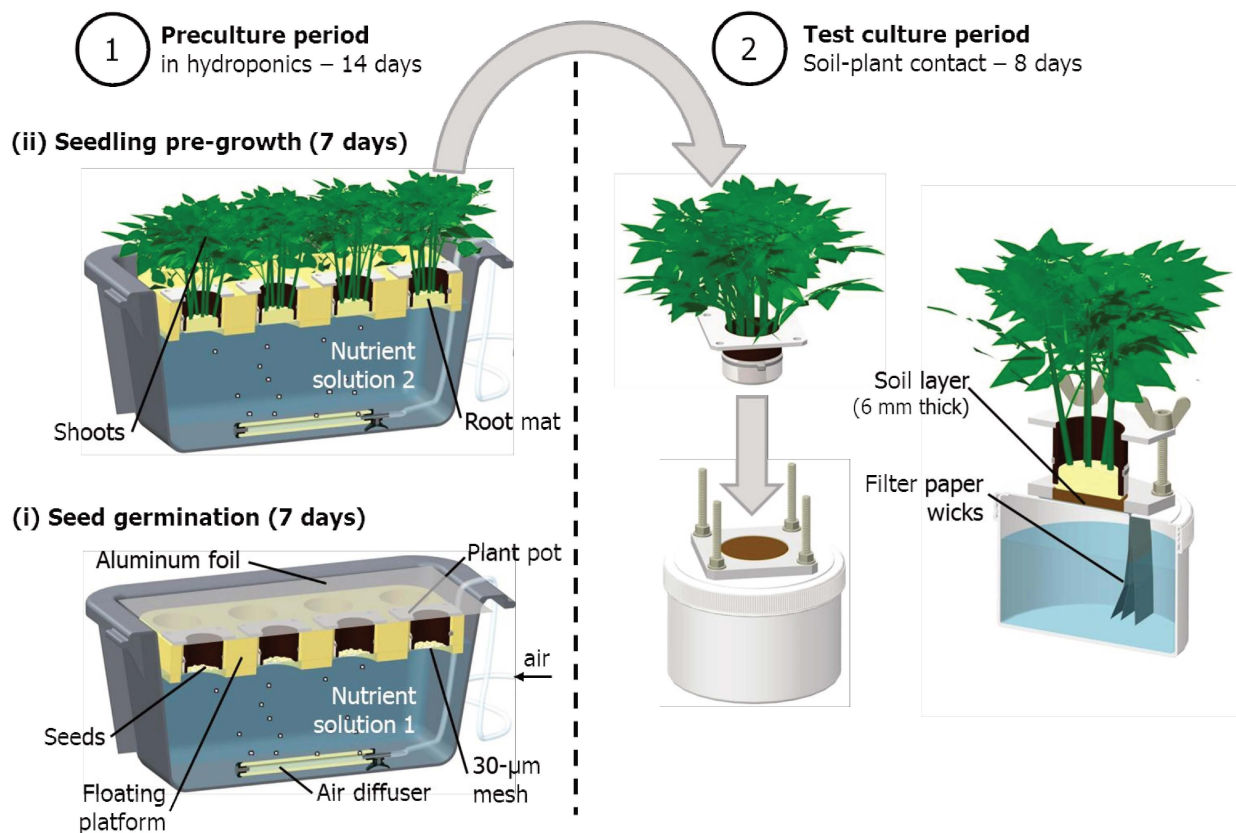
pH_{water} (soil/water ratio=1:5) was analyzed according to ISO 10390. Particle size analysis was carried out by the pipette method (NF X 31–107 method, AFNOR, 2004). The cation exchange capacity (CEC) was measured using cobalt hexamine chloride method (ISO 23470). Organic carbon (ISO 10694) and total nitrogen (ISO 13878) were determined by dry combustion with an elemental analyzer (Flash EA1112SE, Thermo Fisher). Dissolved organic carbon (DOC) was determined using a carbon analyzer (TOC-L CSH, Shimadzu) after soil/water (ratio=1/10) extraction. A representative soil sub-sample was ground to 100 µm and digested (ISO 14869-1) prior to analyses of Ce concentrations by inductively coupled plasma-mass spectrometry (X Series II, Thermo Fischer).

Table S3. PERMANOVA on the whole set of data

	F.Model	Pr(>F)	Significance
Plant species	0.877	0.373626	
Soil	71.787	0.000999	***
Concentration	180.378	0.000999	***
Treatment	14.617	0.000999	***
Residuals	537		

Table S4. PERMANOVA on the set of data expunged from the control treatments (no Ce added)

	F.Model	Pr(>F)	Significance
Plant species	0.358	0.571429	
Ce Type	21.884	0.000999	***
Soil	49.953	0.000999	***
Concentration	146.087	0.000999	***
Treatment	11.588	0.002997	**
Residuals	545		



<u>Nutrient solution 1:</u>	$600 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{CaCl}_2$; $2 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{H}_3\text{BO}_3$
<u>Nutrient solution 2:</u>	$500 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{KH}_2\text{PO}_4$; $2\,000 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{KNO}_3$; $2\,000 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; $1\,000 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{MgSO}_4$; $0,2 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{CuCl}_2$ (6.11); $10 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{H}_3\text{BO}_3$ (6.5); $2 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{MnCl}_2$ (6.12); $1 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ZnSO}_4$; $0,05 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{Na}_2\text{MoO}_4$; $100 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{NaFe(III)EDTA}$
<u>Nutrient solution 3:</u>	$50 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{KH}_2\text{PO}_4$; $2\,000 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{KNO}_3$; $2\,000 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; $1\,000 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{MgSO}_4$

Figure S1: The two-step procedure of RHIZOtest (<http://rhizotest.cirad.fr/en>)

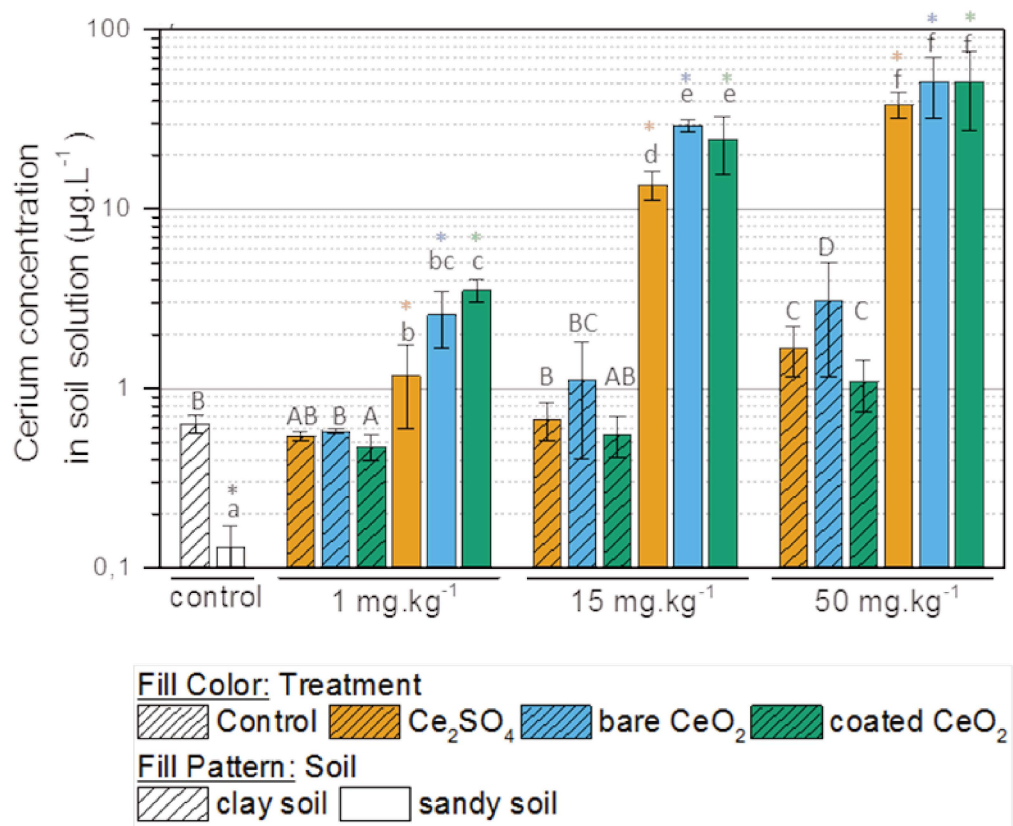


Figure S2: Extracted cerium (µg.L⁻¹) in clay soil and sandy soil (n=4, ± SD) under fescue. Different lower case letters indicate significant differences between modalities (Kruskal-Wallis test) in the sandy soil. Different upper case letters indicate significant differences between modalities (Kruskal-Wallis test) in the clay soil. * indicate significant differences between sandy soil modalities (concentration and treatment) and their analogs on clay soil (p < 0.05).

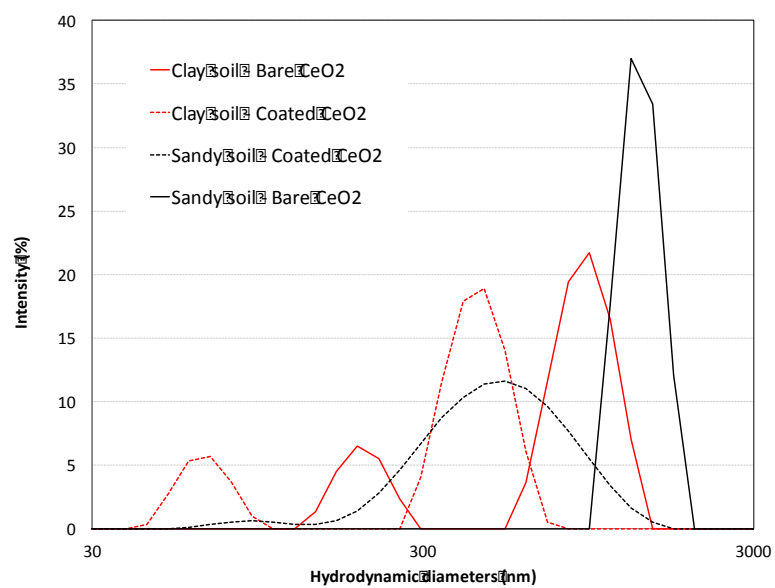


Figure S3. Hydrodynamic diameters of the bare and coated CeO₂ in soil solution extracted from fescue cultivated soils. Measurements were performed 10 min after the NPs injection (10 mg.L⁻¹).

Annexe III SUPPORTING INFORMATION

Phytoavailability of TiO₂ nanoparticles: soil type and nanoparticle shape matters

C. Layet^{1,2}, C. Santaella^{2,3}, M. Auffan^{1,2}, C. Chevassus-Rosset⁴, M. Montes⁴, P. Ortet³, M.

Barakat³, B. Angeletti¹, E. Doelsch^{4*}

(1) Aix-Marseille Univ, CNRS, IRD, Coll de France, CEREGE UM34, 13545 Aix en Provence, France.

(2) iCEINT, International Center for the Environmental Implications of NanoTechnologies, CNRS - Duke university, Europôle de l'Arbois, 13545 Aix-en-Provence, France.

(3) Aix Marseille Univ, CEA, CNRS, Laboratory of Microbial Ecology of the Rhizosphere and Extreme Environments (LEMIRE), Biosciences and biotechnology Institute of Aix-Marseille (BIAM), ECCOREV FR 3098, CEA/Cadarache, St-Paul-lez-Durance, France

(4) CIRAD, UPR Recyclage et risque, F-34398 Montpellier, France.

* Corresponding author: Emmanuel Doelsch doelsch@cirad.fr

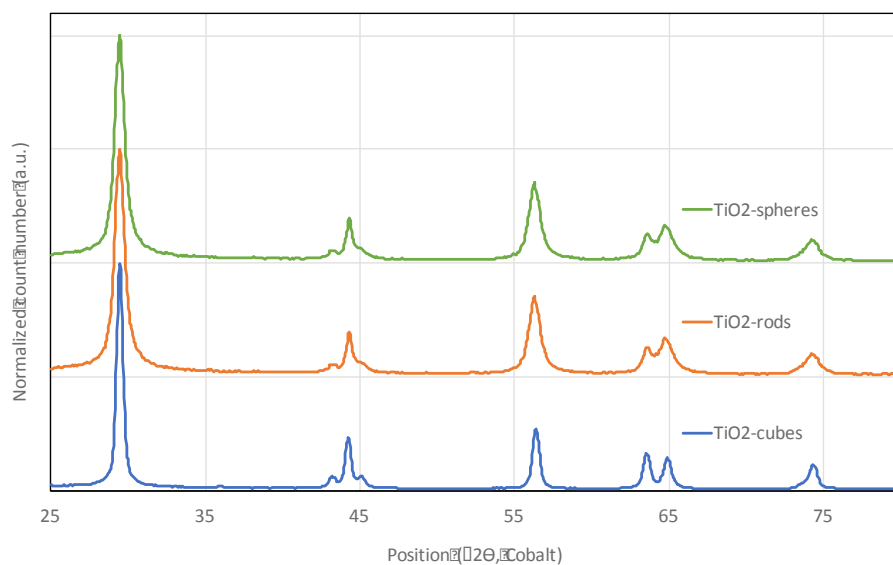


Figure S1: X-Ray Diffractograms of the TiO_2 -spheres, TiO_2 -rods, and TiO_2 -cubes.

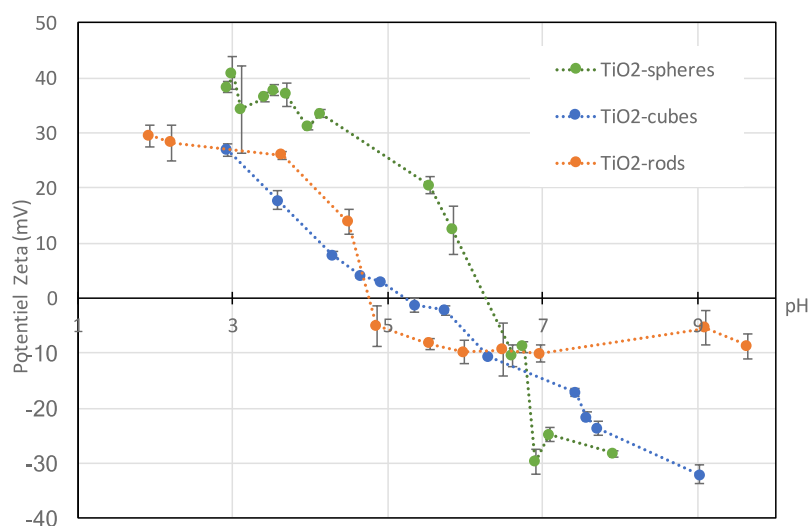


Figure S2: Evolution of the zeta potential as a function of pH of the TiO_2 -spheres, TiO_2 -rods, and TiO_2 -cubes determined in $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1} \text{ NaNO}_3$. $[\text{TiO}_2] = 1 \text{ mg.L}^{-1}$.

Table S1. Characteristics of the soils used.

Soil name (texture)	Taxonomy (WRB)	Location	pH	Organic C (%)	Carbonate (%)	CEC (cmol.kg)	Clay (%)	Silt (%)	Sand (%)
------------------------	-------------------	----------	----	------------------	------------------	------------------	-------------	-------------	-------------

Clay	Vertisol	Hanhofen, Germany	7.1	1.64	1.4	27.2	40.7	34.5	24.5
Loam – high OM	Luvisol	Côte Saint- André, France	6.3	3.93	<0.1	15.3	19.0	41.0	40.0
Loam – high carbonate	Rendosol	Collias, France	8.1	0.15	28.9	5.1	13.9	46.4	39.7
Sandy loam	Gleysol	Siebeldingen, Germany	5.5	1.77	<0.1	10.1	8.2	15.3	76.5

Annexe IV SUPPORTING INFORMATION

Phytoavailability of silver at predicted environmental concentration: the nanoparticulate or ionic form does not matter

C. Layet^{1,2}, C. Santaella^{2,3}, M. Auffan^{1,2}, C. Chevassus-Rosset⁴, M. Montes⁴, P. Ortet³, M.

Barakat³, B. Angeletti¹, E. Doelsch^{4*}

(1) Aix-Marseille Univ, CNRS, IRD, Coll de France, CEREGE UM34, 13545 Aix en Provence, France.

(2) iCEINT, International Center for the Environmental Implications of NanoTechnologies, CNRS - Duke university, Europôle de l'Arbois, 13545 Aix-en-Provence, France.

(3) Aix Marseille Univ, CEA, CNRS, Laboratory of Microbial Ecology of the Rhizosphere and Extreme Environments (LEMIRE), Biosciences and biotechnology Institute of Aix-Marseille (BIAM), ECCOREV FR 3098, CEA/Cadarache, St-Paul-lez-Durance, France

(4) CIRAD, UPR Recyclage et risque, F-34398 Montpellier, France.

* Corresponding author: Emmanuel Doelsch doelsch@cirad.fr

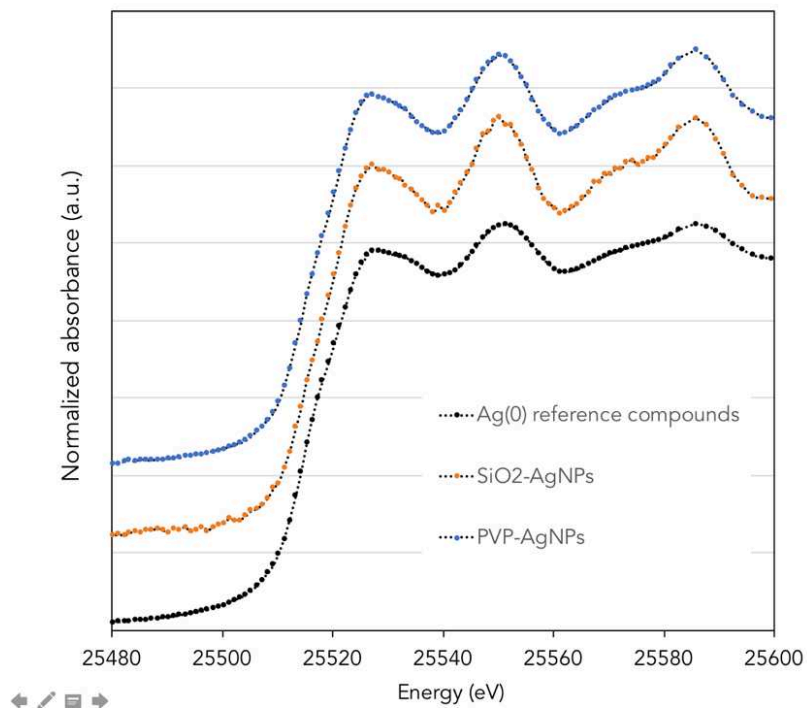


Figure S1. Silver K-edge XANES spectra of the PVP-AgNPs and SiO₂-AgNPs compared to a metallic silver reference compound.

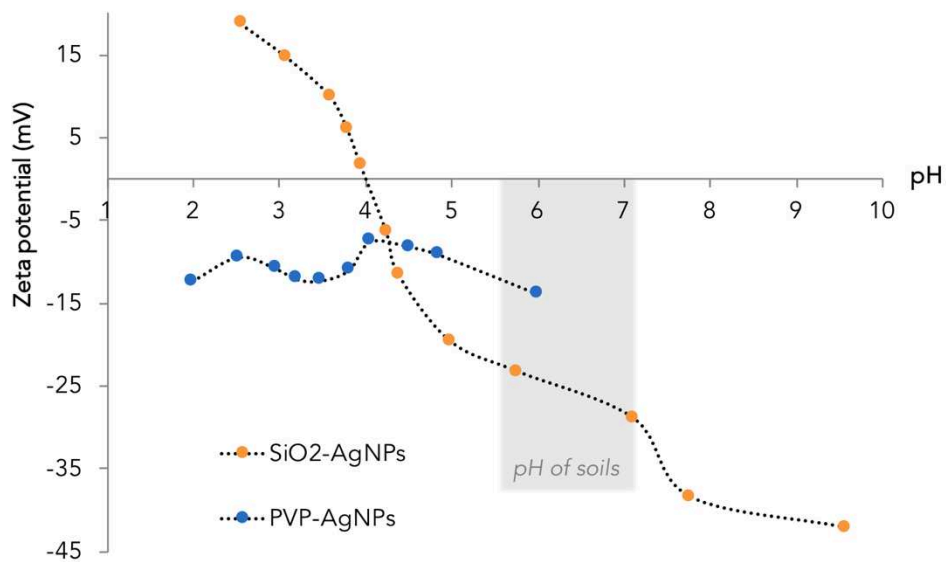


Figure S2. Evolution of the zeta potential of the PVP-AgNPs and SiO₂-AgNPs in Milli-Q water as a function of pH.

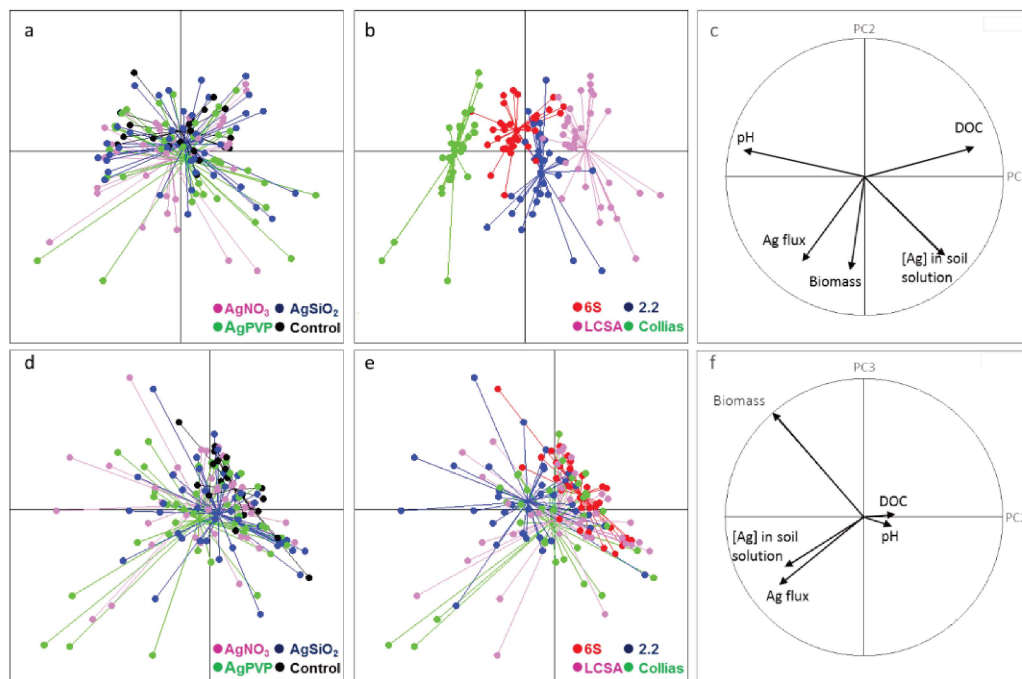


Figure S3. Principal components analysis of the dataset. On the three first principal components, PC1 explained 31.1% of the variability, PC2 23.7% and PC3 18.2%. Score plots according to the type of Ag treatment on PC1 and PC2 (1a) or PC2 and PC3 (1d), and according to the type of soil on PC1 and PC2 (1b) or PC2 and PC3 (1e). Correlation loading plots of the variables on PC1 and PC2 (1c) and PC2 and PC3 (1f). The observations corresponding to the different soils are represented by red dots for the clay loam soil, pink dots for the loam-high MO soil, blue dots for the sandy soil, and green dots for the loam-high carbonate soil. The observations corresponding to the treatment are represented by pink dots for AgNO₃ treatment, blue dots for the AgSiO₂ NPs treatment, green dots for the AgPVP NPs treatment, and black dots for control samples.

Table S1. Characteristics of the soils used.

Soil name (texture)	Taxonomy (WRB)	Location	pH	Organic C (%)	Carbonate (%)	CEC (cmol.kg)	Clay (%)	Silt (%)	Sand (%)
Clay	Vertisol	Hanhofen, Germany	7.1	1.64	1.4	27.2	40.7	34.5	24.5
Loam – high OM	Luvisol	Côte Saint-André, France	6.3	3.93	<0.1	15.3	19.0	41.0	40.0
Loam – high carbonate	Rendosol	Collias, France	8.1	0.15	28.9	5.1	13.9	46.4	39.7
Sandy loam	Gleysol	Sieboldingen, Germany	5.5	1.77	<0.1	10.1	8.2	15.3	76.5

ANNEXE V

Protocole de vieillissement de nanomatériaux de CeO₂ dans des boues de stations d'épuration.

Introduction :

Les boues de stations d'épurations font partie des principaux vecteurs des NMs en fin de vie vers le sol ([Gottschalk et al., 2015](#); [Gottschalk et al., 2009](#); [Keller et al., 2013](#)). L'épandage en sol agricole permet un apport nouveau en matière organique. Les NMs peuvent être intégrés aux processus de traitement des déchets dans les stations d'épuration et être inclus dans les boues. Les différentes phases de traitement peuvent modifier les propriétés des NMs ou modifier leurs spéciations.

[Doolette et al. \(2013\)](#) ont étudié la spéciation de NMs de Ag⁰ enrobé de PVP. Ils ont observé une sulfuration des NMs (Ag₂S). [Barton et al. \(2014\)](#) ont étudié la spéciation des NMs de CeO₂ enrobés de citrate et non enrobés, suite à leur incubation dans des bioréacteurs alimentés en boues de stations d'épuration. Le cérium à l'issue de l'incubation était à 90% lié à la phase solide des boues de stations d'épuration et entre 30 et 45% du cérium issue des NMs, était réduit sous forme de Ce(III). Cette différence de spéciation peut induire une différence de phytodisponibilité.

Etre en mesure d'étudier la phytodisponibilité des NMs dans les conditions les plus réalistes possible était l'une des finalités de la thèse. Nous avons donc simulé un épandage de boue de station d'épuration dans des sols que nous avons mis en contact avec la fétuque élevée avec le dispositif RHIZOtest.

Matériel et méthode

Nanomatériaux.

Nous avons tout d'abord mis en place un protocole d'incubation de NMs de CeO₂ non enrobés (Rhodia, France), ayant une taille moyenne de 3±1 nm, un point de charge nulle compris entre un pH de 7 et de 7.5 ([Tella et al., 2014](#)).

Boues de station d'épuration

Les boues de stations de d'épuration ont été récupérées dans une station d'épuration d'Aix-En-Provence. Les boues ont été installées dans deux réacteurs de 20 L. Un des réacteurs n'a pas été alimenté en NMs et constituait le témoin. Le deuxième réacteur était régulièrement alimenté avec une suspension de NM. L'objectif était de concentrer la phase solide dans les réacteurs à 10 g.L⁻¹ pendant six semaines. L'aération des boues dans les réacteurs était maintenue pour un taux d'oxygène compris entre 1 et 3 mg.L⁻¹. Un volume de 500 mL était prélevé quotidiennement. Un volume de suspension de NMs de CeO₂ était quotidiennement ajouté en conséquence pour obtenir une concentration en fin

d'incubation de 200 mg.kg^{-1} . En effet, [Barton et al. \(2014\)](#), dans un protocole similaire, ont observé que 90 % du CeO_2 ajouté était présent dans la phase solide des boues de station d'épuration. Afin d'augmenter la concentration en matière sèche, les réacteurs étaient alimentés quotidiennement avec un mélange de 77% de Viandox (Knorr-Unilever) et de 23% de glucose. Les quantités étaient apportées tout en maintenant une DCO (demande chimique en oxygène) de 0.25g dans les deux réacteurs.

Le taux d'oxygène en solution et le pH était quotidiennement contrôlé pour ajuster l'oxygénation des réacteurs. Le dispositif est illustré dans la [Figure 1](#). Le mode d'alimentation est inspiré du protocole de [Barton et al. \(2014\)](#). A l'arrêt des réacteurs, la matière sèche était récupérée par centrifugation et séchage en étuve à 30°C .

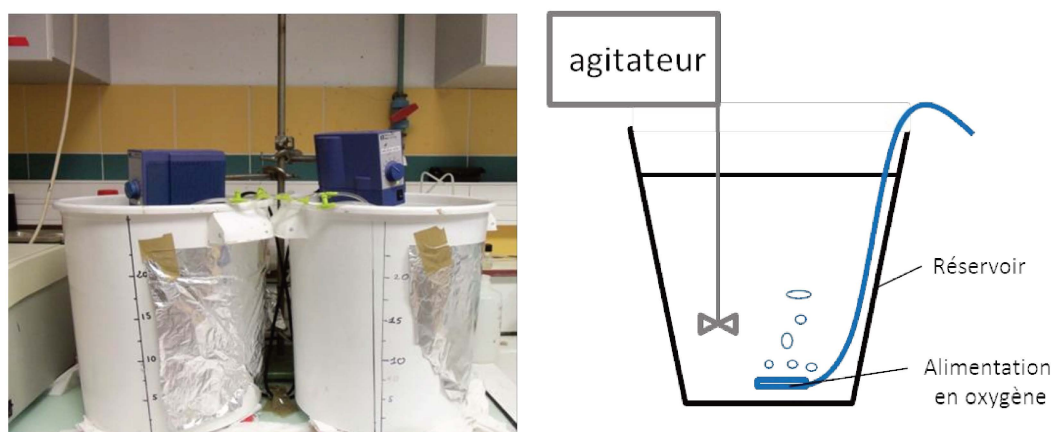


Figure 1: Dispositif d'alimentation des boues de stations d'épuration

Phytodisponibilité du Cérium inclus dans les boues de stations d'épuration

Lors du RHIZOtest, nous avons contaminé un lot de sols avec les boues de stations d'épurations, et un deuxième lot avec les mêmes NMs utilisés lors de l'incubation dans les bioréacteurs. La concentration d'exposition correspond à 1 mg.kg^{-1} de CeO_2 dans les sols. Contrairement aux expérimentations précédentes, les NMs de CeO_2 étaient ajoutés aux sols en même temps que les boues de station d'épurations, c'est-à-dire, quatorze jours avant la mise en contact entre le sol et les plantes. Lors de la récolte les tiges et les racines ont été séparées puis minéralisées. La concentration en cérium a été mesurée par analyse ICP-MS. Les solutions du sol ont été extraites et mélangées à $250 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ avant mesure de la concentration en cérium par ICP-MS.

Spéciation du Cérium dans les boues de stations d'épuration

Une partie de la phase solide a été récupérée lors de l'arrêt des réacteurs. La spéciation du Cérium a été déterminée par spectroscopie des rayons X (XANES), au seuil L_3 du Cérium, sur la ligne SAMBA à la Source Optimisée de Lumière d'Énergie Intermédiaire du LURE (SOLEIL, Gif-sur-Yvette, France). Les échantillons ont été analysés en mode fluorescence, sur la ligne de faisceau, avec un

détecteur Canberra 35-elements. Nous avons comparé le signal issu des boues à une référence de CeO_2 (Nanobyk) et une référence de Cerium(III) (Ce(III)-acétate).

Statistiques

Des comparaisons multiples ont été effectuées sur les valeurs de flux de cérium dans les plantes et de concentration en cérium dans la solution du sol, en utilisant le test de Kruskal Wallis. Les p-values étaient corrigées avec la méthode de Benjamini-Hochberg (BH). Les tests ont été effectués avec le logiciel R (library agricolae).

Résultats

Spéciation du cérium dans les boues de stations d'épuration

Les boues ont été extraites et la phase solide a été récupérée après centrifugation et séchage en étuve. La concentration en cérium dans la phase solide mesurée par ICP-MS, est égale 195 mg.kg^{-1} . Un échantillon de la phase solide a été congelé lors de l'arrêt des réacteurs afin de déterminer la spéciation du cérium. La spéciation a été déterminée par Spectrométrie d'absorption des rayons X (XANES).

Les résultats sont présentés dans la Figure 2. L'analyse met en évidence une réduction du Cérium(IV) en Cérium(III) dans les boues de stations d'épuration. Nous avons analysé le flux complet de cérium dans la plante et la concentration en cérium dans la solution du sol. Les comparaisons multiples entre les différentes modalités ont été effectuées avec un test de Kruskal-Wallis, sur le logiciel R.

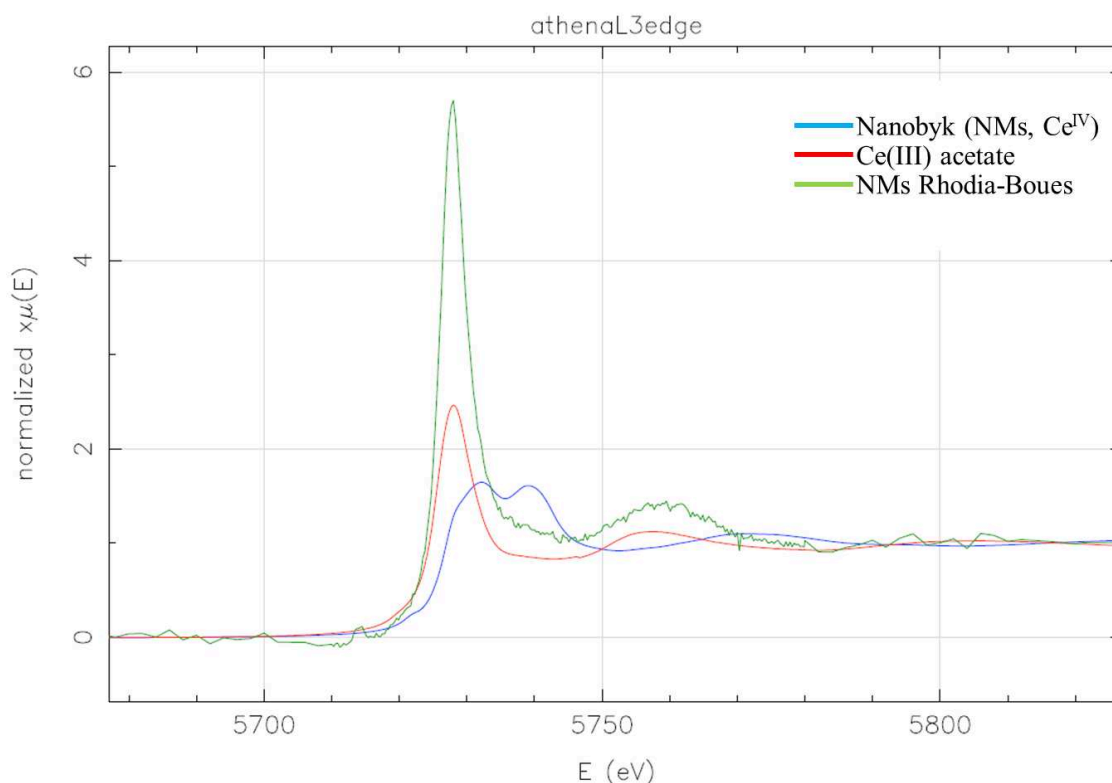


Figure 2: Spectre normalisé XANES au seuil L_3 de l'élément Cérium dans les références Ce(III) acétate et Nanobyk, et dans les boues de stations d'épuration.

Phytodisponibilité du Cérium inclus dans les boues de stations d'épuration

Les résultats concernant les flux et la concentration en cérium dans la solution du sol sont illustrés dans la Figure 3: Flux de cérium (A), et concentration en cérium dans la solution du sol (B). Pour un même sol, sont comparés les résultats issus des sols ayant reçu un épandage de boue de STEP, ou directement de NMs de CeO_2 . Les échantillons témoins et traités ayant reçu un épandage de boue de STEP sont suivis de la mention « -boue ». Les autres échantillons n'ont soit reçu aucun traitement (témoins dans épandage de STEP), ou seulement une contamination par les NMs de CeO_2 .

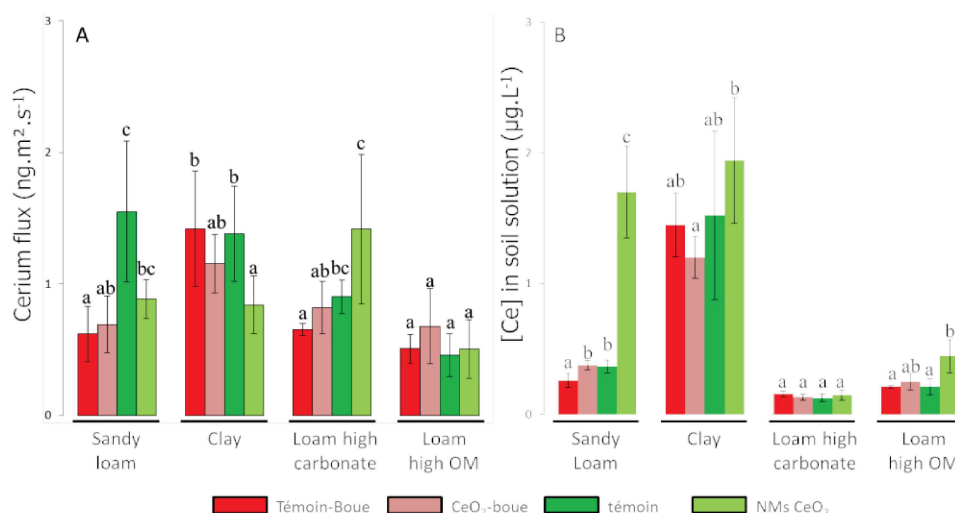


Figure 3: Flux de cérium (A), et concentration en cérium dans la solution du sol (B). Pour un même sol, sont comparés les résultats issus des sols ayant reçu un épandage de boue de STEP, ou directement de NMs de CeO_2

Les premières analyses mettent en évidence une absence de différence significative entre les flux de cérium témoin et les flux de cérium issus des plantes exposées aux NMs, quel que soit la forme de l'apport du cérium (NMs de CeO_2 , ou cérium dans les boues). En revanche, en ce qui concerne la concentration en cérium dans la solution du sol, nous avons remarqué une augmentation de la concentration, comparée au témoin, pour les deux types d'épandage sur les sols « Sandy loam » et « Loam high carbonate ». De plus, sur ces deux derniers sols, la concentration en cérium dans la solution du sol traité uniquement avec des NMs de CeO_2 est plus importante que la concentration en cérium dans la solution du sol traité avec des boues de stations d'épuration. Cette différence n'est pas significative sur le sol Loam high OM.

A partir de ces premiers résultats, nous pouvons conclure que la rétention du cérium dans les boues est plus importante que le cérium appliqué directement dans les sols. Cette différence de rétention n'a pas de répercussion sur la phytodisponibilité du cérium. Nous supposons qu'une exposition prolongée des plantes aux sols contaminés peut augmenter la sensibilité du RHIZOtest.

References

- Barton, L. E., Auffan, M., Bertrand, M., Barakat, M., Santaella, C., Masion, A., Borschneck, D., Olivi, L., Roche, N., Wiesner, M. R., and Bottero, J. Y. (2014). Transformation of Pristine and Citrate-Functionalized CeO₂ Nanoparticles in a Laboratory-Scale Activated Sludge Reactor. *Environmental Science & Technology* **48**, 7289-7296.
- Doolette, C. L., McLaughlin, M. J., Kirby, J. K., Batstone, D. J., Harris, H. H., Ge, H., and Cornelis, G. (2013). Transformation of PVP coated silver nanoparticles in a simulated wastewater treatment process and the effect on microbial communities. *Chemistry Central Journal* **7**, 46.
- Gottschalk, F., Lassen, C., Kjoelholt, J., Christensen, F., and Nowack, B. (2015). Modeling Flows and Concentrations of Nine Engineered Nanomaterials in the Danish Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **12**, 5581-5602.
- Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R. W., and Nowack, B. (2009). Modeled Environmental Concentrations of Engineered Nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for Different Regions. *Environmental Science & Technology* **43**, 9216-9222.
- Keller, A. A., McFerran, S., Lazareva, A., and Suh, S. (2013). Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *Journal of Nanoparticle Research* **15**.
- Tella, M., Auffan, M., Brousset, L., Issartel, J., Kieffer, I., Pailles, C., Morel, E., Santaella, C., Angeletti, B., Artells, E., Rose, J., Thiery, A., and Bottero, J. Y. (2014). Transfer, Transformation, and Impacts of Ceria Nanomaterials in Aquatic Mesocosms Simulating a Pond Ecosystem. *Environmental Science & Technology* **48**, 9004-9013.